

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Obor: Fyziologie živočichů



Kateřina Neumannová

**Adenosinové receptory a transportéry v srdci potkana: vliv adaptace na
chronickou hypoxii**

**Adenosine receptors and transporters in rat myocardium: the effect of
adaptation to chronic hypoxia**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 8. 2016

Podpis

Poděkování:

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za odborné vedení této diplomové práce, trpělivost a připomínky při zpracování práce. Další poděkování patří Pavlu Vebrovi za provedení části experimentu na Langendorffově perfuzním systému. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu laboratoře za veškerou pomoc a rady i vytvoření příjemných pracovních podmínek. Také chci poděkovat své rodině za podporu a zázemí po celou dobu studia. V neposlední řadě pak děkuji svému příteli za podporu i užitečné rady při zpracování práce.

1. Abstrakt

Adaptace na chronickou hypoxii je vedle ischemického preconditioningu jedním ze dvou známých kardioprotektivních mechanismů. Přesné molekulární základy těchto procesů však stále nejsou úplně vysvětleny. Existují studie, které naznačují možné zapojení adenosinergního signálního systému v této adaptaci.

V této práci jsme se zaměřili na charakterizaci adenosinergního systému v myokardu potkanů adaptovaných za dvou typů chronické hypoxie – protektivní kontinuální normobarické hypoxie (CNH) a neprotektivní intermitentní hypoxie (INH/R, 23 h hypoxie a 1 h normoxie). Nejdříve jsme porovnávali celkové množství adenosinových receptorů u jednotlivých skupin adaptace. Objevili jsme změny hlavně u receptoru A_{2B} , kde došlo k nárůstu u CNH a poklesu u INH/R. Tento výsledek naznačuje možnou účast receptoru A_{2B} v kardioprotekci adaptací na chronickou hypoxii.

Dále jsme zkoumali distribuci jednotlivých typů adenosinových receptorů a transportérů v plazmatické membráně buněk srdce. Ukázalo se, že receptory A_{2A} a A_3 lokalizují v membránových mikrodoménách stejně jako membránový enzym CD73, který tvoří adenosin v extracelulárním prostoru z AMP. Receptory A_1 a A_{2B} stejně jako nukleosidové transportéry ENT1, ENT2 a CNT2 pak byly lokalizovány spíše ve většinové (neraftové) frakci membrány. Tyto výsledky naznačují, že výběr daného adenosinového receptoru pro signalizaci, může souviset s původem uvolněné signální molekuly adenosinu.

Klíčová slova: adenosin, adenosinové receptory, adenosinové transportéry, chronická hypoxie, srdce

2. Abstract

Adaptation to chronic hypoxia is in addition to ischemic preconditioning one of the two known cardioprotective mechanisms. The precise molecular basis of these processes is still not fully explained. There are some studies that suggest the possible involvement of the adenosinergic signaling system in this adaptation.

In this work, we focused on the characterization of the adenosinergic system in the myocardium of rats adapted to two regimens of chronic hypoxia - a protective continuous normobaric hypoxia (CNH) and non-protective intermittent hypoxia (INH/R, 23 h hypoxia and 1 h normoxia). Initially, we compared the total amount of adenosine receptors in samples from different groups of adapted animals. We discovered changes mainly at A_{2B} receptor, which increased at CNH and declined in INH/R. This result suggests the possible involvement of A_{2B} receptors in cardioprotection afforded by adaptation to chronic hypoxia.

Furthermore, we investigated the distribution of various types of adenosine receptors and transporters in the plasma membrane of cardiac cells. We observed that A_{2A} and A₃ localize in membrane microdomains together with membrane enzyme CD73 that produces adenosine in the extracellular space by degrading AMP. A₁ and A_{2B} receptors similarly as nucleoside transporters ENT1, ENT2 and CNT2 were localized rather in the bulk (non-raft) plasma membrane fraction. These results indicate that the selection of a given adenosine receptor for signaling may be associated with the origin of adenosine released as a signaling molecule.

Keywords: adenosine adenosine receptors, adenosine transporters, chronic hypoxia, heart

3. Obsah

1. Abstrakt	4
2. Abstract	5
3. Obsah	6
4. Seznam zkratek	8
5. Úvod	10
6. Literární přehled	11
6.1. Adenosinová signalizace	11
6.1.1. Metabolismus adenosinu	11
6.1.2. Adenosinové transportéry.....	13
6.1.3. Adenosinové receptory	16
6.1.4. Membránové mikrodomény	19
6.2. Srdce a hypoxie	21
6.2.1. Ischemický preconditioning.....	22
6.2.1.1. Role adenosinu v IPC.....	23
6.2.1. Adaptace na chronickou hypoxii	24
7. Cíle diplomové práce	26
8. Materiál a metody.....	27
8.1. Laboratorní zvířata.....	27
8.1.1. Předběžný experiment zaměřený na vliv ischemie	27
8.2. Homogenizace a frakcionace	28
8.2.1. Roztoky	28
8.2.2. Pracovní postup.....	29
8.2.3. Izolace hrubých membrán.....	29
8.2.4. Izolace membránových mikrodomén.....	30
8.3. Stanovení proteinů BCA metodou	30
8.3.1. Roztoky	30
8.3.2. Postup.....	31
8.4. SDS-PAGE elektroforéza.....	31

8.4.1. Roztoky	32
8.4.2. Postup.....	33
8.5. Western blotting a imunodetekce	34
8.5.1. Roztoky	34
8.5.2. Postup.....	35
8.6. Analýza a vyhodnocení výsledků	36
9. Výsledky.....	37
9.1. Hrubé membrány.....	37
9.1.1. Expres receptoru A_1	38
9.1.2. Expres receptoru A_{2A}	39
9.1.3. Expres receptoru A_{2B}	40
9.1.4. Expres receptoru A_3	41
9.2. Membránové mikrodomény.....	42
9.2.1. Expres receptoru A_1	43
9.2.2. Expres receptoru A_{2A}	45
9.2.3. Expres receptoru A_{2B}	47
9.2.4. Expres receptoru A_3	49
9.2.5. Expres transportéru ENT1	51
9.2.6. Expres transportéru ENT2	53
9.2.7. Expres transportéru CNT2	55
9.2.8. Expres dalších proteinů	57
9.3. Výsledky předběžného pokusu zaměřeného na vliv ischemie	59
9.3.1. Expres receptoru A_{2B}	59
9.3.1. Expres receptoru A_3	60
10. Diskuse.....	61
11. Závěr.....	68
12. Literatura	70

4. Seznam zkratek

AC	adenylátcykláza
ADA	adenosindeamináza
ADP	adenosindifosfát
AK	adenosinkináza
Akt	proteinkináza B
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	AMP aktivovaná proteinkináza
AR	adenosinový receptor
ATP	adenosintrifosfát
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD39	ektonukleosidtrifosfátdifosforyláza 1
CD71	transferinový receptor
CD73	ekto-5'-nukleotidáza
CNH	skupina potkanů chovaná v kontinuální normobarické hypoxii
cN-I	AMP-selektivní cytosolická 5'-nukleotidáza
cN-II	IMP-selektivní cytosolická 5'-nukleotidáza
CNT	koncentrační nukleosidový transportér
COX2	cyklooxygenáza 2
CrP	kreatinfosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ENT	ekvilibrační nukleosidový transportér
ER	endoplazmatické retikulum
ERK	kináza regulovaná extracelulárním signálem
GDP	guanosindifosfát
GPCR	receptor spřažený s G-proteinem
GTP	guanosintrifosfát
HIF	hypoxií indukovaný faktor
HM	hrubé membrány

IMP	inosinmonofosfát
INH/R	skupina potkanů chovaná v intermitentní normobarické hypoxii
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
IPC	ischemický preconditioning
K _{ATP}	ATP-senzitivní draslíkový kanál
kDa	kilodalton
KHB	Krebs Henseleit pufr
LV	levá komora myokardu
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
mitoK _{ATP}	mitochondriální K _{ATP}
N	kontrolní skupina potkanů (chovaná v normoxii)
NBMPR	nitrobenzylthioinosin
P	pelet
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolipáza C
PNP	fosforyláza purinových nukleosidů
PNS	postnukleární supernatant
PTP	přechodně propustný pór (permeability transition pore)
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
rpm	otáčky za minutu
RV	pravá komora myokardu
S	supernatant
SAH	S-adenosyl-L-homocystein
SAHH	SAH hydroláza
sarck _{ATP}	sarkolemální K _{ATP}
SLB	Laemmliho vzorkový pufr (sample loading buffer)
SOD	superoxiddismutáza
TF	transkripční faktor

5. Úvod

Srdeční choroby jsou nejčastější příčinou úmrtí v dnešním světě. Řada laboratoří se proto zaměřila na výzkum známých kardioprotektivních mechanismů – ischemického preconditioningu a adaptace na chronickou hypoxii. Pochopení molekulárních mechanismů těchto procesů může pomoci k vývoji nových léčiv. Bylo ukázáno, že kardioprotekce preconditioningem se účastní také některé komponenty adenosinergního signálního systému. Doposud však není známo, zda se také účastní protekce vyvolané adaptací na chronickou hypoxii, přestože bylo objeveno, že tyto mechanismy alespoň částečně sdílí stejné signální dráhy.

Adenosin, jakožto produkt ATP, vzniká hlavně při vysoké spotřebě této hlavní energetické molekuly. Stejně tak je jeho tvorba zvýšená při nedostatku kyslíku. Následnou extracelulární signalizací adenosin působí na snížení energetických nároků buněk a na zvýšení dodávky potřebných metabolitů. Tím se uplatňuje jako jedna z důležitých molekul v ochraně buněk proti hypoxii.

Pro adenosinovou signalizaci jsou zásadní adenosinové receptory – A_1 , A_{2A} , A_{2B} a A_3 . Všechny čtyři se nacházejí v srdci a všechny působí protektivně v ischemicko-reperfúzním poškození. Pro adenosinovou signalizaci jsou však také důležité další molekuly zajišťující nárůst extracelulární hladiny adenosinu, který pak může signalizovat prostřednictvím receptorů. Mezi tyto molekuly patří extracelulární membránové enzymy, které odbourávají adeninové nukleotidy na adenosin – CD39 a CD73. Dále také enzymy, které tvoří adenosin v buňce (cN-I a SAHH), a nukleosidové transportéry (ENT a CNT), který jej následně přenáší do extracelulárního prostoru.

Hlavním cílem této práce je zjistit, zda se při chronické hypoxii, tedy trvalém nedostatku kyslíku, adenosinergní systém mění. Jestli dochází ke snížení nebo naopak zvýšení exprese jednotlivých komponent adenosinové signalizace za těchto podmínek.

6. Literární přehled

6.1. Adenosinová signalizace

Adenosin je purinový nukleosid. Kromě toho, že je součástí několika důležitých molekul jako ATP, RNA nebo cAMP, sám funguje jako extracelulární signální molekula prostřednictvím adenosinových receptorů.

Rozsah adenosinové signalizace je dán koncentrací extracelulárního adenosinu a koncentrací a typem adenosinového receptoru. Koncentrace extracelulárního adenosinu je určena jeho tvorbou (v buňce i vně), odbouráváním a transportem přes buněčnou membránu.

6.1.1. Metabolismus adenosinu

Nejen adenosin ale také ATP a jeho další metabolity (ADP, AMP) fungují jako signální molekuly. Jejich účinek je však odlišný. Proto je pro signalizaci zásadní také metabolismus těchto molekul (Obr. 1).

Hlavní cesta tvorby adenosinu je degradace ATP v buňce. Tedy jeho odbourávání přes ADP, AMP až na adenosin. Za normálních podmínek je však většina ADP i AMP refosforylována a adenosin se tvoří jen minimálně (Barsotti and Ipata, 2004).

V buňce může být adenosin tvořen také hydrolýzou S-adenosyl-L-homocysteinu (SAH). Tato cesta přispívá k intracelulární tvorbě adenosinu za normoxie jednou třetinou. Za hypoxie v srdci se však její příspěvek nezvětšuje a v porovnání s tvorbou adenosinu hydrolýzou ATP je zanedbatelný (Deussen et al., 1989).

Druhou nejvýznamnější cestou tvorby adenosinu je hydrolýza ATP extracelulárně. Toho se účastní membránový enzym CD39 (ektonukleosidtrifosfátdifosforyláza), který katalyzuje hydrolýzu ATP na AMP, a CD73 (ekto-5'-nukleotidáza), jenž odbourává AMP na adenosin.

Extracelulární hladina adenosinu roste za podmínek nedostatku energie a kyslíku. To je dáno vzniklou nerovnováhou v jeho tvorbě a odbourávání za těchto podmínek. Vyšší spotřebou ATP přirozeně roste tvorba ADP, AMP i adenosinu v buňce. Aby byl udržen stálý poměr ATP a ADP nutný pro chod buňky, je v první fázi ATP doplněno

kreatinkinázovou cestou, tedy přenosem fosfátu z kreatinfosfátu (CrP) na ADP. V druhé fázi je aktivována adenylátkináza. Tento enzym tvoří ze dvou molekul ADP jednu molekulu ATP a jednu molekulu AMP. Tím je sice udržen poměr ATP a ADP, ale hladina AMP ještě více roste. AMP následně aktivuje hlavní metabolický senzor buňky AMPK (AMP aktivovaná proteinkináza), která aktivuje mechanismy vedoucí k tvorbě energie (aktivace transportu glukózy, glykolýzy, β -oxidace mastných kyselin) a snížení jejich ztrát (inhibice syntézy většiny molekul) (Aymerich et al., 2006).

Kromě toho může být AMP dále odbouráváno dvěma cestami. AMP deaminázou za vzniku IMP nebo enzymem cN-I (AMP selektivní cytosolická 5'-nukleotidáza) za vzniku adenosinu. První cesta je využívána hlavně za klidových podmínek. Za nedostatku kyslíku a energie je pak tvořen převážně adenosin (Barsotti and Ipata, 2004). Současně je hypoxií inhibována adenosinkináza (AK) (Morote-Garcia et al., 2008), která za normálních podmínek většinu adenosinu refosforyluje zpět na AMP (Decking et al., 1997; Kroll et al., 1993). To vede k hromadění adenosinu v buňce, který je následně přenesen do extracelulárního prostoru nukleosidovými transportéry. Extracelulárně poté signalizuje prostřednictvím adenosinových receptorů.

Také bylo ukázáno, že hypoxie je stimulem pro uvolnění ATP z buňky (Gourine et al., 2005). Ten je následně degradován na adenosin membránovými enzymy CD39 a CD73 a přispívá tak ke zvýšení jeho extracelulární hladiny.

Během hypoxie působí zvýšená hladina adenosinu na snížení energetického nároku buněk. Jednak je po transportu do okolních buněk refosforylován na AMP, který sám nedokáže procházet buněčnou membránou. Ten pak aktivuje hlavní metabolický senzor buňky AMPK (Aymerich et al., 2006). Dále působí adenosin přes receptory A_1 a A_3 zpomalení metabolismu a snížení energetických nároků buňky (Maldonado et al., 2013). Jeho působení na hladkou svalovinu cév vede k vasodilataci a tedy zvýšení dodávky potřebných metabolitů tkáním (Kitakaze et al., 1999).

Za normálních podmínek, tedy při dostatku energie i kyslíku, je naopak potřeba udržet hladinu extracelulárního adenosinu konstantní. Toho se účastní hlavně dva enzymy – již zmíněná adenosinkináza a adenosindeamináza (ADA). AK refosforyluje adenosin na AMP v buňce. ADA se nachází jak v buňce tak extracelulárně a odbourává adenosin na inosin.

jako k dalším inhibitorům dipyridamolu, dilazepu nebo drafrazinu. ENT2 je naopak typem necitlivým k inhibitorům (Kiss et al., 2000). Oba dva transportéry jsou velmi rozšířené a nachází se téměř ve všech buňkách a tkáních včetně srdce (Young et al., 2013).

ENT3 se na rozdíl od ostatních ENT nenachází na plazmatické membráně, ale v membráně lysozomu. Stejně jako u většiny lyzozomálních proteinů je pro jeho funkci optimální kyselé pH okolo 5,5. Pravděpodobně slouží k exportu nukleosidů z lysozomu, čímž je zachraňuje před degradací (Baldwin et al., 2005).

Čtvrtý identifikovaný člen této skupiny ENT4 se také vyskytuje v srdci. S ostatními ENT má malou sekvenční podobnost, což naznačuje, že se oddělil už dávno v evoluci. Jeho funkce je také poněkud odlišná. Vedle adenosinu totiž transportuje i monoaminy a organické kationty. Významný je hlavně transport serotoninu, který se uplatňuje při vývoji srdce. Transport adenosinu tímto přenašečem je za normálního pH zanedbatelný. Zvyšuje se pak při kyselém pH s optimem okolo 5,5. To může jednak znamenat, že je pro přenos využíván symport s H^+ . Ale hlavně možnou roli tohoto transportéru při ischemii (Barnes et al., 2006).

Všechny ENT sdílí společnou strukturu jedenácti transmembránových α -helixů s C-koncem vně a N-koncem uvnitř buňky (Sundaram et al., 2001) (Obr. 2b).

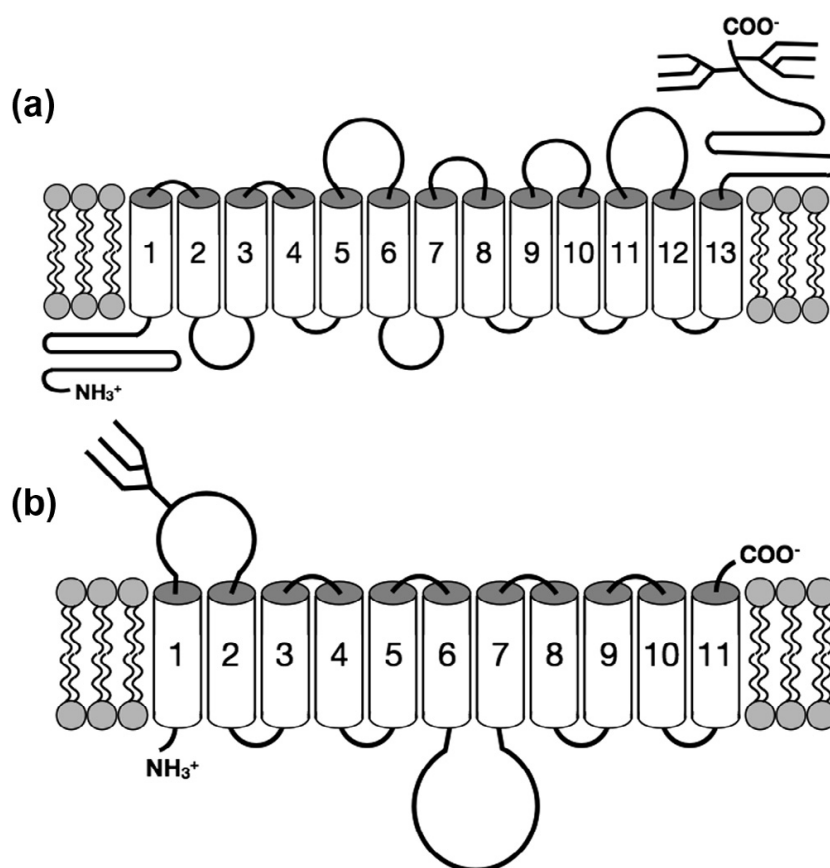
Koncentrační nukleosidové transportéry (CNT) využívají symport se sodnými ionty. Nejdříve váží právě ion, čímž se zvýší afinita pro nukleosid, který je následně transportován (Smith et al., 2004). Umožňují tedy přenos pouze směrem do buňky a účastní se tak až zpětného vychytávání adenosinu. K adenosinu mají vyšší afinitu než ENT, ale rychlost přenosu je nižší (Smith et al., 2004).

Dosud byly popsány 3 izoformy, CNT1-3. Všechny mají společnou strukturu 13 transmembránových α -helixů s C-koncem na extracelulární straně a N-koncem uvnitř buňky (Hamilton et al., 2001) (Obr. 2a).

CNT1 slouží jako transportér pro pyrimidinové nukleosidy. Adenosin váže s vysokou afinitou, ale nefunguje pro něj jako přenašeč (Larrayoz et al., 2004). Také jeho výskyt je omezený. Je exprimován pouze na apikálních membránách epitelálních tkání jako střevo, ledviny a játra (Hamilton et al., 2001).

CNT2 je poněkud více rozšířený a nachází se i v srdci (Young et al., 2013). Je specifickým přenašečem purinových nukleosidů, tedy i adenosinu (Wang et al., 1997). Stejně jako CNT1 (Smith et al., 2004) má stechiometrii transportu jeden ion Na^+ na jeden nukleosid (Smith et al., 2007).

Vedle toho CNT3 potřebuje pro transport dvě molekuly Na^+ (Smith et al., 2007). Kromě toho však může pro přenos využít i jednu molekulu H^+ nebo jeden Na^+ s jedním H^+ (Smith et al., 2005). Z nukleosidů transportuje jak purinové, tak i pyrimidinové. V jednotlivých tkáních je podobně jako CNT2 také poměrně rozšířen (Ritzel et al., 2001). Normálně se nachází na plazmatické membráně, ale existuje i isoforma, která se nachází na ER (Errasti-Murugarren et al., 2009).



Obr. 2 Sekundární struktura koncentračních nukleosidových transportérů (a) a ekvilibračních nukleosidových transportérů (Dos Santos-Rodrigues et al., 2014)

6.1.3. Adenosinové receptory

Signalizace extracelulárního adenosinu je zprostředkována adenosinovými receptory. Dosud známe 4 subtypy – A_1 , A_{2A} , A_{2B} a A_3 . Všechny jsou příbuzné a patří do třídy A receptorů spřažených a G-proteiny (GPCRs).

GPCRs představují největší rodinu membránových proteinů v lidském genomu. Všichni členové této proteinové rodiny sdílejí společnou strukturu 7 transmembránových α -helixů s N-koncem extracelulárně a C-koncem uvnitř buňky. Nejvíce homologní jsou GPCRs v oblasti transmembránových segmentů. Mezi nejvíce variabilní části patří C-konec, intracelulární smyčka mezi pátým a šestým transmembránovým helixem a úplně největší diverzita byla pozorována u N-konce, který se podílí na vazbě ligandu. Jednotlivé ligandy pro GPCRs jsou totiž velmi odlišné. Pohybují se v rozmezí od subatomárních částic, jako je foton, přes ionty a malé organické molekuly až po peptidy a proteiny (Kobilka, 2007).

Podle sekvenční podobnosti v oblasti TM segmentů se GPCRs dělí do pěti rodin. Největší je právě rhodopsinová rodina (třída A), která zahrnuje většinu GPCRs. Další rodiny jsou glutamátová, sekretinová, adhezní a frizzled. Adenosinové receptory, které patří do rhodopsinové rodiny, jsou si vzájemně podobné. Největší sekvenční podobnost sdílejí receptory A_{2A} a A_{2B} (59 %) a receptory A_1 a A_3 (49 %) (Jacobson and Gao, 2006).

Molekulu GPCR můžeme rozdělit na 3 hlavní části – extracelulární část zahrnující extracelulární smyčky a N-konec, transmembránové α -helixy a intracelulární smyčky s C-koncem. Každá z těchto částí má odlišný úkol. Cílem extracelulární části je vazba příslušného ligandu. Ten pak způsobí konformační změnu, která je přenesena do buňky prostřednictvím transmembránových helixů. Intracelulární část má pak za úkol vazbu daného heterotrimerního G-proteinu a jeho aktivaci.

Rodina heterotrimerních G-proteinů je poměrně malá a velmi homologní. Skládají se ze tří podjednotek – α , β a γ . Po navázání ligandu na receptor dojde k jeho konformační změně, která vyvolá výměnu GDP navázaného na G-protein za GTP. To vede k disociaci G-proteinu na solubilní α podjednotku s navázaným GTP a

membránově vázaný dimer $\beta\gamma$. $G\alpha$ i $G\beta\gamma$ následně aktivují řadu signálních drah, čímž regulují mnoho fyziologických funkcí (Liu et al., 2016).

$G\alpha$ podjednotky se podle své aktivity dělí do 4 rodin – $G\alpha_s$, $G\alpha_i/o$, $G\alpha_q/11$ a $G\alpha_{12/13}$ (Liu et al., 2016). Pro adenosinové receptory je typická hlavně interakce s G-proteiny, které ovlivňují činnost adenylátcyklázy (AC). Receptory A_1 a A_3 interagují s G_i/o a AC inhibují. Naopak receptory A_{2A} a A_{2B} působí přes G_s a AC aktivují. Tímto působením následně zvyšují nebo snižují hladinu cAMP, který pak působí na další molekuly v buňce (Obr. 3).

Druhým důležitým enzymem, který adenosinové receptory ovlivňují, je fosfolipáza C (PLC). Ta je aktivována G-proteinem $G_q/11$ přes receptory A_1 , A_{2B} a A_3 . Výsledkem této signální dráhy je pak nárůst cytoplazmatické hladiny vápenatých iontů (Abbracchio et al., 1995; Cordeaux et al., 2004; Panjehpour et al., 2005).

Vedle těchto hlavních signálních drah ovlivňují adenosinové receptory ještě řadu dalších signálních molekul. Přes G_i/o proteiny, tedy signalizací receptoru A_1 a A_3 stimulují draslíkové kanály a inhibují kanály pro vápenaté ionty (Fredholm et al., 2001a). Všechny čtyři adenosinové receptory mají také schopnost aktivovat MAP kinázy (Schulte and Fredholm, 2003).

Afinita jednotlivých receptorů k adenosinu není stejná. Kvůli rychlému metabolismu adenosinu také není úplně jednoduché afinitu určit. Poločas života adenosinu v extracelulárním prostředí je asi 10 s. Pak je rychle degradován na inosin (Welihinda et al., 2016).

Adenosinové receptory mohou být rozděleny na vysokoafinní (A_1 , A_{2A} a A_3), které mohou být aktivovány i nízkou hladinou adenosinu, a na nízkoafinní (A_{2B}), které jsou aktivovány až při zvýšené hladině adenosinu, tedy například při hypoxii. Tato charakterizace však není pro přenos informace prostřednictvím těchto receptorů úplně výstižná, neboť pro účinnost agonisty je důležitý i počet receptorů. Proto jsou také receptory A_3 většinou aktivovány až při zvýšené hladině adenosinu, neboť jejich rozmístění na membránách je velmi řídké (Fredholm et al., 2001b). Hustota rozmístění receptorů se také může lišit mezi jednotlivými tkáněmi. Tam, kde je rozmístění receptorů husté, bude mít adenosin významnější fyziologickou roli. Avšak v místech,

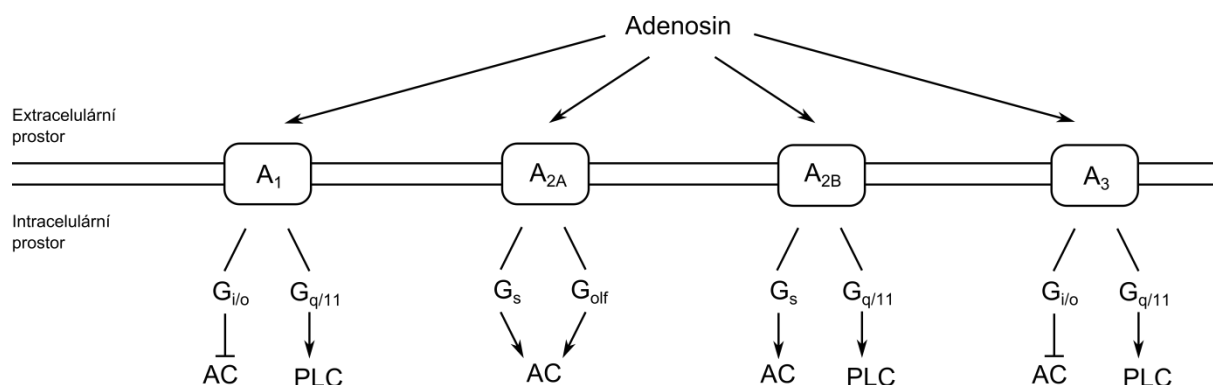
kde je adenosinových receptorů málo, se bude uplatňovat až v patofyziologických procesech (Fredholm, 2010).

Vedle počtu receptorů také záleží na tom, prostřednictvím které následné dráhy tuto účinnost agonisty měříme. Při měření hladiny cAMP, tedy při aktivaci nebo inhibici AC, platí, že receptory A_1 a A_{2A} jsou aktivovány klidovou hladinou adenosinu a receptory A_{2B} a A_3 hladinou zvýšenou. Avšak pro aktivaci jiných drah, jako např. MAPK, může být účinnost adenosinu u všech receptorů stejná (Schulte and Fredholm, 2000).

Vedle adenosinu mohou být AR aktivovány i dalšími ligandy. Inosin je parciálním agonistou receptorů A_1 a A_3 (Fredholm et al., 2001b), ale také A_{2A} (Welihinda et al., 2016). AMP potom může aktivovat receptor A_1 (Rittiner et al., 2012).

Stejně jako tvorba adenosinu i výskyt adenosinových receptorů je rozšířen po celém těle. Rozmístění a hustota jednotlivých subtypů však není stejná. Receptor A_1 má největší výskyt v mozku, tukové tání a varlatech, méně pak v srdci a ledvinách. A_{2A} se nachází také v mozku, kde má největší hustotu ve striatu. Dále se vyskytuje ve větší míře v srdci a plicích. Největší výskyt receptoru A_{2B} je ve střevu a močovém měchýři, dále také v retině a mozku. Receptor A_3 se nachází hlavně ve varlatech, srdci a retině (Rivkees and Wendler, 2013).

V srdci se vyskytují všechny 4 adenosinové receptory. A_1 má výskyt největší v myocytech síní a o něco méně v komorách myokardu. A_{2A} se nachází hlavně v cévách, jak v membránách buněk endotelu tak hladké svaloviny. Byl objeven také v myocytech. Stejně tak A_{2B} má výskyt hlavně v buňkách endotelu a hladké svaloviny cév, ale také ve fibroblastech. I A_3 se nachází v buňkách myokardu, jeho výskyt je však velmi řídký (Rivkees and Wendler, 2013).



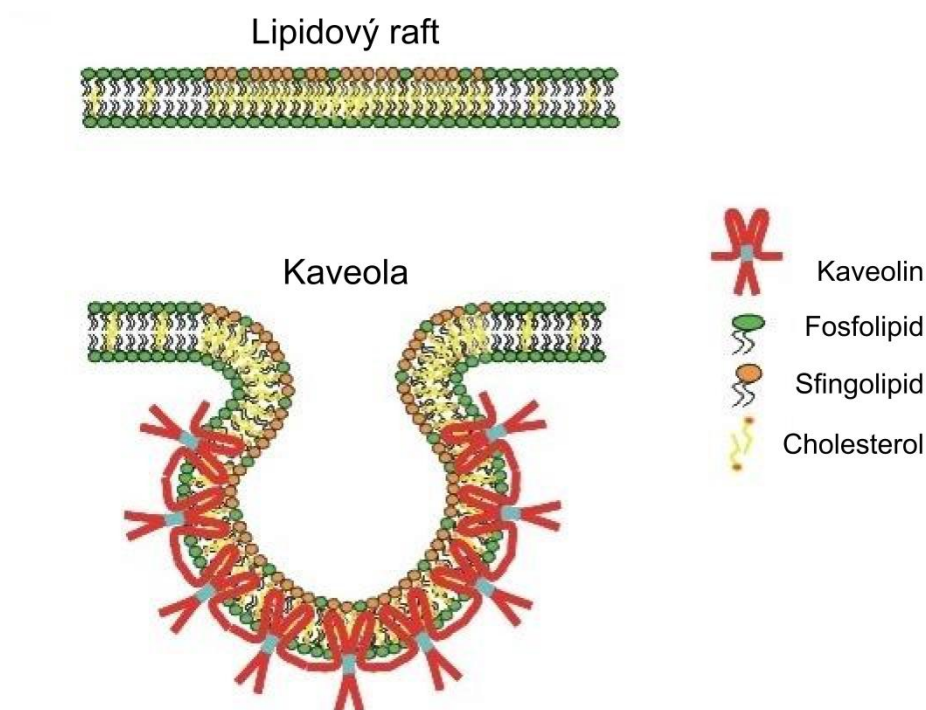
Obr. 3 Hlavní dráhy signalizace adenosinových receptorů. AC – adenylátcykláza, PLC – fosfolipáza C

6.1.4. Membránové mikrodomény

Buněčná signalizace může být regulována rozmístěním jednotlivých komponent signální kaskády v buněčné membráně. Většinou jsou umístěny v membránových mikrodoménách – lipidových raftech a kaveolách. To jsou části buněčné membrány se specifickým složením fosfolipidů i proteinů. Lokalizace signálních molekul v mikrodoménách pak zajišťuje jejich dostatečnou blízkost a tak rychlejší signální transdukci.

Membránové mikrodomény ale slouží nejen k urychlení signální transdukce, ale také k jejímu upřesnění a možnosti efektivnější regulace. Pro přenos daného signálu je nutná přesná časoprostorová shoda. Tím membránové mikrodomény přispívají k různorodosti odpovědí na stejný signál (Amadio et al., 2011).

Kaveoly jsou asi 50-100 nm velké invaginace buněčné membrány s charakteristickým složením obohaceným o sfingolipidy a cholesterol (Obr. 4). Dostatečná koncentrace cholesterolu je pro ně kritická a při jeho nedostatku zanikají (Chang, 1992). Od planárních lipidových raftů se liší přítomností proteinu kaveolinu. Ten jednak způsobuje typickou invaginaci, ale také slouží jako scaffold pro další proteiny (Anderson, 1993).



Obr. 4 Planární lipidový raft a kaveola (upraveno podle http://www.ruf.rice.edu/~rur/issue1_files/razani.html 3.8.2016)

Kaveoly mohou agregovat ve specifické části membrány a tvořit shluky. Když tyto pak přiléhají k membráně sousední buňky, vypuštěné signální molekuly doputují pouze k této buňce. Tak by mohly kaveoly tvořit „chemické synapse“ mezi jinými než neuronálními buňkami. Adeptem pro tento způsob signalizace je právě adenosin. Buňkou uvolněný AMP je v kaveole enzymem CD73 přeměněn na adenosin (Strohmeier et al., 1997). Po stimulu k otevření kaveol pak putuje k adenosinovým receptorům na sousední buňce a následně je rychle degradován ADA (Anderson, 1993).

Je známo, že kaveoly jsou bohaté na mnohé komponenty GPCR signálních drah (Ostrom and Insel, 2004). Z adenosinergního signálního systému byl nejdříve v kaveolách objeven membránový protein CD73 (Strohmeier et al., 1997). Tento enzym katalyzuje defosforylaci AMP na adenosin. Ten je následně rychle přeměněn na inosin. Blízká lokalizace adenosinových receptorů by tedy byla výhodná pro optimální signalizaci (Anderson, 1993).

Později se ukázalo, že všechny adenosinové receptory obsahují kaveolin vazebný motiv (Mundell and Kelly, 2011). To však nemusí přímo znamenat jejich lokalizaci

v těchto mikrodoménách, ale například pouze jejich internalizaci prostřednictvím kaveol.

Receptor A_1 byl objeven v kaveolách za bazálních (klidových) podmínek. Po přidání agonisty tohoto receptoru však proti očekávání receptor difundoval z kaveol ven (Lasley et al., 2000). Další výzkum ukázal právě možnost internalizace receptoru A_1 prostřednictvím kaveol (Escriche et al., 2003).

Receptor A_{2B} , zdá se, lokalizuje spíše v neraftové části membrány. Po stimulaci adenosinem se sice částečně přesouvá do kaveol, ale většina signálu zůstává i nadále ve většinové (nekaveolární) části membrány (Sitaraman et al., 2002). O lokalizaci dalších adenosinových receptorů v kaveolách zatím není mnoho zmínek.

O umístění nukleosidových transportérů v membránových mikrodoménách se literatura příliš nezmiňuje. Existují pouze zmínky o výskytu CNT v kaveolách (Duflot, 2002; Errasti-Murugarren et al., 2010).

6.2. Srdce a hypoxie

Onemocnění srdce patří mezi nejnebezpečnější život ohrožující onemocnění dnešní doby. Srdce je velmi citlivé zejména k nedostatku kyslíku a ischemická choroba srdeční je stále nejčastější příčinou smrti v západní civilizaci (Murray and Lopez, 1997). Proto je snaha vyvinout metody, které by zvýšily odolnost srdce k nedostatku kyslíku.

Jsou známy dva hlavní kardioprotektivní mechanismy – ischemický preconditioning a adaptace na chronickou hypoxii. Pochopení molekulárních základů těchto mechanismů je zásadní pro vývoj nových léčiv.

Na hypoxii odpovídají buňky produkcí hypoxií indukovaných transkripčních faktorů (HIF), zejména HIF-1 α . Jeho působení vede ke snížení mitochondriálního metabolismu a tím i snížení produkce ROS, čímž chrání buňku před poškozením. Také významně ovlivňuje expresi mnoha proteinů adenosinergního signálního systému. Mimo jiné se váže na promotor enzymu CD73, čímž zvyšuje jeho expresi (Synnestvedt et al., 2002). Druhý enzym nutný pro extracelulární produkci adenosinu z ATP CD39 je hypoxií také indukován, a to přes transkripční faktor Sp-1 (Eltzschig et al., 2010). Tím roste extracelulární produkce adenosinu. V buňce je hladina adenosinu zvýšena hlavně

díky většímu odbourávání ATP. Výrazně ale také přispívá snížená refosforylace adenosinu v důsledku inhibice AK hypoxií přes TF HIF1- α (Morote-Garcia et al., 2008).

Expresi transportérů ENT1 a ENT2 naopak HIF-1 α snižuje, čímž zpomaluje vychytávání adenosinu a zajišťuje tak jeho delší působení (Eckle et al., 2013; Eltzschig et al., 2005; Morote-Garcia et al., 2009). Také exprese CNT je za hypoxie snižena (Medina-Pulido et al., 2013).

Adenosinovou signalizaci HIF1- α také posiluje zvýšením exprese adenosinových receptorů, zejména A_{2B} (Kong et al., 2006). Receptor A_{2A} je pak indukován přes transkripční faktor HIF2- α (Ahmad et al., 2009; Kobayashi et al., 1998).

Při ischemicko-reperfúzním poškození srdce působí adenosin protektivně přes všechny čtyři adenosinové receptory. Jednotlivé subtypy se pak liší načasováním svého ochranného účinku. Signalizace přes receptory A₁ a A₃ je protektivní hlavně při jejich aktivaci před a při ischemii (Lankford et al., 2006; Tracey, 1997). Receptory A_{2A} a A_{2B} se pak uplatňují ve snížení reperfúzního poškození, a to hlavně díky svému imunosupresivnímu působení (Patel et al., 2009; Xi et al., 2009).

6.2.1. Ischemický preconditioning

Ischemický preconditioning (IPC) znamená střídání krátkých period ischemie a reperfúze předcházející vlastnímu ischemickému poškození. Poprvé tuto experimentální techniku popsal Murry et al. (1986). Jeho skupina provedla na psím modelu čtyři série pětiminutové ischemie následované pětiminutovou reperfúzí. Následná čtyřicetiminutová ischemie způsobila infarkt myokardu. Ten byl však výrazně menší než u kontrolních zvířat.

Hlavním účinkem IPC je zmenšení infarktu. Ale působí také snížení arytmií a zlepšení kontraktility myokardu (Zaugg and Schaub, 2003).

IPC působí kardioprotekci tím, že vyvolává uvolnění autakoidů (humorálních faktorů). Ty obsazují receptory na buněčném povrchu a spouští signální kaskády, které vedou až ke konečným efektorům zajišťujícím kardioprotekci. Efektu IPC se dá také dokázat pomocí farmak, která spouští stejné signální dráhy. Pak mluvíme o farmakologickém preconditioningu (Yang et al., 2010).

Ačkoliv přesné mechanismy a signální dráhy nejsou doposud úplně objasněny, je známo, že mezi ligandy, které navozují IPC, patří adenosin, opioidy, bradykinin a prostaglandiny. Tyto molekuly se vážou na své receptory a spouští signální dráhy. Všechny tyto dráhy pak konvergují na aktivaci PKC (Sadigh et al., 2009; Yang et al., 2010).

Hlavním mechanismem kardioprotekce je nakonec otevření ATP senzitivních draslíkových kanálů (K_{ATP}). Toho bylo docíleno mimo jiné také aktivací receptoru A_1 (Van Winkle et al., 1994).

Existují 2 typy K_{ATP} – sarkolemální ($sarck_{ATP}$) a mitochondriální ($mitoK_{ATP}$). Z nich se kardioprotekce účastní pravděpodobně spíše $mitoK_{ATP}$ (Liu et al., 1998), i když existují i zmínky o zapojení $sarck_{ATP}$ (Toller et al., 2000). Následný vtok K^+ do mitochondrií je hlavním mechanismem udržujícím zavřený PTP (přechodně propustný pór), čímž brání apoptóze (Zaugg and Schaub, 2003). Otevřený PTP totiž jinak rozpráhuje mitochondrie a tím ničí mnoho myocytů hlavně při reperfúzi (Yang et al., 2010).

IPC vede ke kardioprotekci ve dvou fázích. Akutní neboli raná fáze nastupuje hned po IPC a trvá pouze několik hodin. Pozdní fáze pak nastupuje asi 24 h po IPC a trvá 3-4 dny. Raná fáze je účinnější a účastní se jí již zmíněné autakoidy včetně adenosinu, dále PKC a K_{ATP} . Nezbytný je také transkripční faktor HIF1- α (Eckle et al., 2008). Pozdní fáze zahrnuje *de novo* syntézu proteinů jako iNOS, COX-2, SOD a dalších (Bolli et al., 1997; Guo et al., 2012; Marber et al., 1993).

Klinické využití IPC pro snížení efektu ischemie je ale problematické. Tento problém byl vyřešen pomocí tzv. RIPC (remote ischemic preconditioning) (vzdálený IPC). Ukázalo se totiž, že pro tkáň je protektivní i IPC provedený jinde. To platí nejen pro srdce, ale i další tkáně a orgány (Haapanen et al., 2016).

6.2.1.1. Role adenosinu v IPC

Jak již bylo zmíněno dříve, adenosin je jednou z molekul, které spouští IPC. I samotná infuze adenosinu pak vede u lidí k navození IPC (Sadigh et al., 2009). Hlavním předpokladem je zvýšení jeho tvorby. K tomu za hypoxie dochází, jak již bylo vysvětleno v kapitole o metabolismu. Navíc je při hypoxii zvýšena exprese

membránového enzymu CD39 (Eltzschig et al., 2010) a také CD73, jehož činnost byla dlouho považována za zásadní pro IPC (Eckle et al., 2007; Hart et al., 2008). Existuje však jedna studie, která tuto nezbytnost aktivace CD73 popírá (Wolff et al., 2015).

Extracelulární adenosin pak působí přes své receptory. Nejdříve bylo ukázáno zapojení receptoru A_1 v kardioprotekci navozené IPC (Liu et al., 1991; Solenkova et al., 2006). Stejný efekt má i aktivace receptoru A_3 (Carr, 1997). Později se však pro IPC ukazuje důležitost hlavně receptoru A_{2B} , jehož exprese je zvýšena přes transkripční faktor HIF1- α (Eckle et al., 2008; Kuno et al., 2007). Dále je tento receptor, jehož afinita k adenosinu je za normálních okolností nízká, senzitivován fosforylací PKC. Následně pak může být aktivován adenosinem vypuštěným ischemickými kardiomyocyty (Kuno et al., 2007; Yang et al., 2010). Senzitivovaný receptor A_{2B} pak aktivuje kinázy PI3K, Akt a ERK, které inhibují tvorbu mitochondriálního PTP (Yang et al., 2010).

Tato protektivní signalizace přes receptor A_{2B} má cirkadiální rytmicitu. To je způsobeno prostřednictvím hodinového genu *per2*. Protein Per2 vznikající expresí tohoto genu má protektivní účinky při ischemii. Například snižuje velikost infarktu, pomáhá stabilizovat transkripční faktor HIF1- α a také zefektivňuje glykolýzu. Exprese Per2, je stabilizována jednak světlem, ale také právě aktivací receptoru A_{2B} při ischemii. Adenosin jednak působí přímo zvýšení exprese Per2 aktivací AC přes Gs-protein spřažený s receptorem A_{2B} . AC pak tvoří cAMP, který aktivuje TF CREB. Ten pak nasedá na promotor genu *per2* a zvyšuje jeho expresi. Aktivace A_{2B} receptoru také stabilizuje protein Per2 post-translačně inhibicí proteasomu. To pak ve výsledku vede k menšímu poškození myokardu. Protože se tato stabilizace proteinu Per2 dá navodit i světlem, mluvíme o tzv. světelném preconditioningu (Eckle et al., 2012).

6.2.1. Adaptace na chronickou hypoxii

Druhým kardioprotektivním mechanismem je adaptace na chronickou hypoxii. Už dlouho je známo, že u lidí žijících ve vysoké nadmořské výšce a tedy nižším parciálním tlaku kyslíku je nižší výskyt kardiovaskulárních onemocnění (Hurtado, 1960). Toto bylo později dokázáno i experimentálně (Turek et al., 1980).

Srdce musí i za sníženého množství kyslíku zachovat stejnou funkci. Toho docílí právě adaptací. Adaptace je komplexní děj, který má pozitivní i negativní účinky. Mezi

ty pozitivní patří právě snížené riziko infarktu myokardu nebo systémové hypertenze. Negativními důsledky je pak plicní hypertenze, která následně vede k hypertrofii pravé komory. To může vést až k srdečnímu selhání (Haddad et al., 2008).

Protektce adaptací na chronickou hypoxii trvá déle než ischemický preconditioning – až několik týdnů po normoxii (Ostadal 1994), ale přesto je méně studována.

Efekty těchto dvou kardioprotektivních mechanismů se pravděpodobně nesčítají. I když existuje studie, která tvrdí, že efekty se sčítají a tudíž tyto mechanismy nesdílejí společné signální dráhy (Tajima et al., 1994). V experimentu těchto autorů bylo ukázáno, že IPC ještě prohlubuje kardioprotekci navozenou adaptací na chronickou hypoxii. Toto však není úplně v rozporu s pozdější studií Neckáře et al. (2002), která tvrdí, že efekty těchto mechanismů se nesčítají. Tato studie ukázala, že kardioprotekce prostřednictvím IPC je silnější a tudíž může ještě prohlubovat protekci navozenou adaptací na chronickou hypoxii. Avšak efekt IPC byl stejný i u kontrolních zvířat, což právě naznačuje, že nedošlo k pouhému sečtení efektů těchto kardioprotektivních mechanismů. Tento výsledek také podporuje hypotézu, že oba mechanismy sdílejí alespoň částečně stejné signální dráhy. Například otevření $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ je vedle IPC zapojeno také v kardioprotekci intermitentní hypoxií (Neckar et al., 2002).

Chronická hypoxie přes TF HIF1- α hlavně zvyšuje expresi proteinů glykolytického metabolismu a pro transport glukózy (Feldhaus and Liedtke, 1998). Následná zvýšená produkce ATP vede k menšímu poškození buněk hypoxií. Glykolýza je také efektivnější než metabolismus mastných kyselin, který normálně představuje 60-80% produkce ATP v srdci. U adaptovaných jedinců také dochází k většímu využití laktátu (Ullah et al., 2006).

V akutní hypoxii i ischemickém preconditioningu má adenosinová signalizace většinou velmi protektivní účinky. Ale jaká je jeho role v adaptaci na chronickou hypoxii a jak se za těchto podmínek mění celý adenosinergní systém nebylo zatím odhaleno. Tyto poznatky by ale mohly výrazně přispět k vývoji nových léčiv.

7. Cíle diplomové práce

1. Vypracovat metodiku pro detekci adenosinových receptorů a transportérů pomocí techniky imunoblotingu.
2. Charakterizovat adenosinové receptory v hrubých membránách izolovaných z levých a pravých komor myokardu potkanů adaptovaných na hypoxii za různých podmínek.
3. Porovnat lokalizaci adenosinových receptorů a transportérů v membránových mikrodoménách a jejich případné přesuny při adaptaci srdce na chronickou hypoxii.
4. Zkoumat vliv ischemie na expresi adenosinových receptorů v srdci potkanů adaptovaných na kardioprotektivní režim hypoxie.

8. Materiál a metody

8.1. Laboratorní zvířata

K experimentům byli použiti dospělí samci laboratorního potkana kmene Wistar (hmotnost 250–300 g). Potkani byli rozděleni do tří skupin (N, CNH a INH/R) a následně po dobu tří týdnů adaptováni za různých podmínek. Kontrolní skupina potkanů (N) byla chována v normoxii. Skupina CNH byla chována v kontinuální normobarické hypoxii, tedy 24 h denně v 10% koncentraci O₂. Skupina INH/R byla v hypoxii jen 23 h a následně 1 hodinu v normoxii.

Poté byli potkani usmrceni cervikální dislokací a bylo jim vyjmuto srdce. To bylo následně rozděleno na pravou a levou komoru a septum. Jednotlivé části pak byly zamrazeny v tekutém dusíku a do dalšího zpracování uchovány v teplotě -80°C. Použity byly pravé i levé komory.

8.1.1. Předběžný experiment zaměřený na vliv ischemie

Dospělí samci potkanů kmene Wistar byli rozděleni na 2 skupiny po 6 zvířatech. Jedna skupina (H) byla chovaná po dobu 18 dní v intermitentní normobarické hypoxii (8 h denně v 10% O₂). Kontrolní skupina (K) byla chovaná v normoxii.

Poté byli potkani usmrceni cervikální dislokací a bylo jim vyjmuto srdce tak, aby byla zachována aorta v délce alespoň 2-3 mm. Srdce bylo rychle zavěšeno na Langendorffův perfúzní systém. Perfúze byla provedena Krebs Henseleit pufrem (KHB) (Tabulka 1) s pH 7,4 a teplotou 37 °C. Nejdříve bylo srdce ponecháno 15 minut stabilizovat. Poté byla provedena desetiminutová ischemie přerušením průtoku pufru. Následovala reperfúze po dobu 30 minut. U poloviny srdcí z každé skupiny probíhala perfúze pomocí hydrostatického tlaku (T), kdy byla nádoba s pufrem zavěšena 80 cm nad srdcem. Do druhé poloviny byl pufr čerpán pomocí pumpy (P). Nakonec bylo srdce sňato z perfúzního systému, osušeno a zamrazeno v tekutém dusíku a uchováno do dalšího zpracování v teplotě -80 °C.

Srdce byla rozdělena na pravou a levou komoru, které byly dále zpracovány na vzorky hrubých membrán.

Tabulka 1: Složení Krebs Henseleitova pufru

složka	koncentrace (mM)
C ₆ H ₁₂ O ₆	11
NaCl	118,5
NaHCO ₃	25
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
KCl	4,7
CaCl ₂	1,2

8.2. Homogenizace a frakcionace

8.2.1. Roztoky

Tabulka 2: Roztoky pro homogenizaci a frakcionaci myokardu

Homogenizační pufr TMES	20 mM Tris-HCl (pH 7,4) 3 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 250 mM sacharóza
Pufr TME	20 mM Tris-HCl (pH 7,4) 3 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA

8.2.2. Pracovní postup

1. Po vyjmutí z mrazáku byly vzorky srdeční tkáně přeneseny do odpovídajícího množství TMES pufru (4 ml pufru na 1 g tkáně) a byly přidány inhibitory proteáz (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche), které zabraňují degradaci proteinů.
2. Poté byla tkáň nastříhána nůžkami na malé kousky a homogenizována přístrojem Ultra-Turrax při 24 000 rpm po dobu 2x15 s.
3. Dále byla směs homogenizována sklo-teflonovým homogenizátorem při 1200 rpm 10x nahoru a dolů (což odpovídá přibližně jedné minutě). Vše probíhalo za chlazení v ledové lázni.
4. Vzniklý homogenát byl stočen na centrifuze (Hettich Universal R30) při 2100 rpm (600 g) po dobu 10 minut v teplotě 4 °C. Vzniklý supernatant (S1) byl odebrán a uchován na ledu.
5. Pelet (P1) byl resuspendován ve stejném objemu TMES jako v kroku 1. Také byly opět přidány inhibitory proteáz. Následně byl homogenizován pomocí Ultra-Turraxu a sklo-teflonového homogenizátoru jako v krocích 2 a 3.
6. Homogenát byl opět stočen na centrifuze (Hettich Universal R30) při 2100 rpm (600 g) po dobu 10 minut v teplotě 4 °C.
7. Byl odebrán vzniklý supernatant (S2) a spojen s předchozím (S1), čímž byl získán postnukleární supernatant (PNS). Část vzorku byla odebrána pro stanovení obsahu proteinů a zbytek dále zpracován pro izolaci hrubých membrán nebo membránových mikrodomén.

8.2.3. Izolace hrubých membrán

8. PNS byl přenesen do centrifugačních zkumavek a stočen při 27 000 rpm po dobu 30 minut (centrifuga Beckman-Coulter, rotor Ti50.2).
9. Vzniklý pelet byl resuspendován v pufru TME, čímž byl získán vzorek hrubých membrán (HM). Část byla odebrána pro stanovení obsahu proteinů a zbytek rozpípetován do mikrozkušavek, zamrazen v tekutém dusíku a uložen v mrazicím boxu při -80 °C.

8.2.4. Izolace membránových mikrodomén

8. Pro izolaci membránových raftů byl použit neiontový detergent Triton X-100 v 2% koncentraci a také 1M Na₂CO₃. Ty byly smíchány se vzorkem PNS (kroky 1-7) v poměru 1:1.
9. Směs byla inkubována na ledu po dobu 1 h.
10. Následnou centrifugací (128 000 g, 60 min, 4 °C) byl získán supernatant a pelet.
11. Supernatant, který odpovídá neraftové frakci membrány, byl rozpipetován do mikrozkušavek, zamrazen v tekutém dusíku a uchován v mrazicím boxu při teplotě -80 °C.
12. Pelet, jenž odpovídá membránovým mikrodoménám, byl resuspendován v 1 ml pufru TME a také zamrazen.

8.3. Stanovení proteinů BCA metodou

Bicinchoninic acid assay (BCA) je metoda pro stanovení celkové koncentrace proteinů ve vzorku. Základem je redukce měďnatých kationtů (Ca²⁺) na kationty měďné (Cu⁺), které následně reagují s bicinchoninovou kyselinou za vzniku fialově zabarveného komplexu. Jeho množství je pak stanoveno spektrofotometricky.

8.3.1. Roztoky

Tabulka 3: Roztoky pro stanovení proteinů BCA metodou

Činidlo A (pH 11,25)	8 g monohydrátu uhličitanu sodného 1,6 g vínanu sodného doplnit do 100 ml H ₂ O
Činidlo B	4 g BCA (bicinchoninová kyselina) doplnit do 100 ml H ₂ O
Činidlo C	0,4 g pentahydrátu síranu měďnatého doplnit do 10 ml H ₂ O

8.3.2. Postup

1. Vzorky byly naředěny destilovanou vodou v poměru 1:100 (10 µl vzorku + 990 µl H₂O).
2. Byl připraven pracovní roztok z činidel A, B a C v poměru 26:25:1.
3. Na mikrotitrační destičku byly nanесeny jednotlivé standardy podle Tabulka 4 se známým obsahem proteinů (0,2 µg až 50 µg).
4. Do následujících jamek byly nanесeny jednotlivé vzorky v triplikátech (po 100 µl zředěného vzorku).
5. Do všech jamek (se standardy i vzorky) bylo přidáno 100 µl pracovního roztoku.
6. Destička byla přelepena izolepou a inkubována 30 minut při 60 °C.
7. Po vychladnutí byl obsah proteinů ve vzorcích spektrofotometricky změřen pomocí přístroje Synergy HT (Bio Tek Instruments) při vlnové délce 562 nm.
8. Výsledky byly vyhodnoceny v programu Gen 5.

Tabulka 4: Řada standardů pro stanovení kalibrační křivky

Číslo standardu	BL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
µg BSA	0	0,2	0,5	1,0	1,5	2,5	4	6	10	15	20	30	50
BSA (0,1 µg/µl) [µl]	-	2	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-	-
BSA (1 µg/µl) [µl]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30	50
H ₂ O [µl]	100	98	95	90	85	75	60	40	-	85	80	70	50

8.4. SDS-PAGE elektroforéza

SDS-PAGE elektroforéza je metoda separace proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. SDS v názvu znamená dodecylsulfát sodný. Ten jednak proteiny denaturuje, ale také jim svou vazbou na ně dodává náboj, který je pak přímo úměrný pouze velikosti proteinu a nezáleží už na jeho sekvenci. PAGE potom znamená, že separace probíhá na polyakrylamidovém gelu.

8.4.1. Roztoky

Tabulka 5: Roztoky pro SDS-PAGE elektroforézu

30% akrylamid (0,8% N,N'-methylenbisakrylamid)	30 g akrylamidu 0,8 g N,N'-methylenbisakrylamidu doplnit do 100 ml H ₂ O
Pufr 1 (pH 8,8)	18,17 g Tris-HCl doplnit do 100 ml H ₂ O
Pufr 2 (pH 6,8)	6,05 g Tris-HCl doplnit do 100 ml H ₂ O
10% SDS	10 g SDS doplnit do 100 ml H ₂ O
10% APS	0,1 g APS 1 ml H ₂ O
TEMED	
Running pufr (10x koncentrovaný)	30,3 g Tris-HCl (pH 6,8) 141,1 g glycinu 10 g SDS doplnit do 100 ml H ₂ O
Laemmliho pufr (4x koncentrovaný) (sample loading buffer - SLB)	2,4 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8) 1 ml glycerolu 0,8 g SDS 0,8 g DTT 1 mg bromfenolové modři doplnit do 10 ml H ₂ O

8.4.2. Postup

1. Byla sestavena aparatura pro nalévání gelů Mini Protean II (BioRad) a skla očištěna etanolem.
2. Podle složení v Tabulka 6 byl namíchán 10% dělicí gel, napipetován mezi skla asi 1 cm pod okraj a převrstven butanolem.
3. Po zpolymerování gelu (cca 30-60 minut) byl slit butanol, prostor promyt destilovanou vodou a vysušen filtračním papírem.
4. Zaostřovací gel byl namíchán podle Tabulka 6 a nanesen do zbývajícího prostoru nad dělicím gelem. Ihned po nanesení do něj byl vložen hřebínek.
5. Gel byl ponechán polymerovat asi 20-30 minut. Mezitím byly připraveny vzorky.
 - a. Vzorky HM byly naředěny SLB a destilovanou vodou na výslednou koncentraci 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
 - b. Vzorky membránových mikrodomén byly naředěny pouze SLB.
 - c. Všechny vzorky byly následně povařeny 2 minuty při 100 °C.
6. Skla s gely byla přenesena do vany pro elektroforézu a ta byla zčásti naplněna naředěným running pufrům.
7. Do první jamky byly nanесeny 2 μl standardu (STD) a do dalších jamek byly nanесeny jednotlivé vzorky.
8. Byl připojen zdroj stejnosměrného napětí a nastavena hodnota napětí na 200 V. Elektroforéza probíhala přibližně 1 hodinu.

Tabulka 6: Složení gelů pro SDS-PAGE elektroforézu

10% dělicí SDS-polyakrylamidový gel	8 ml H ₂ O
	5 ml pufru 1
	6,7 ml 30% akrylamidu
	200 μl 10% SDS
	8 μl TEMED
	90 μl 10% APS

4% zaostřovací gel	6 ml H ₂ O
	2,5 ml pufru 2
	1,3 ml 30% akrylamidu
	100 µl 10% SDS
	8 µl TEMED
	90 µl 10% APS

8.5. Western blotting a imunodetekce

Western blotting je metoda pro přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulózovou membránu. Následně jsou vybrané proteiny detekovány pomocí specifických protilátek.

8.5.1. Roztoky

Tabulka 7: Roztoky pro Western blotting a imunodetekci

TBS pufr (10x koncentrovaný) (pH 8)	21,03 g NaCl
	2,9 g Tris
	doplnit do 240 ml H ₂ O
TGM pufr (blotovací pufr)	15 g Tris
	72 g glycinu
	1000 ml methanolu
	doplnit do 5000 ml H ₂ O
Blokovací pufr (blocking buffer)	1,5 g sušeného mléka
	50 ml TBS
	50 µl Tween 20

Ředící pufr (diluting buffer)	0,5 g sušeného mléka
	50 ml TBS
	50 µl Tween 20
Promývací pufr (washing buffer)	100 ml TBS
	900 ml H ₂ O
	3 ml Tween 20

8.5.2. Postup

- Po ukončení elektroforézy byla skla s gely vyjmuta z aparatury a byl odstraněn nepotřebný zaostřovací gel.
- Dělicí gel byl přenesen na nitrocelulózovou membránu a vložen do aparatury pro Western blotting, která byla naplněna TGM pufrem.
- Přenos proteinů na membránu probíhal za konstantního napětí 100 V po dobu jedné hodiny.
- Membrány byly po skončení blotování obarveny pomocí ponceau S pro porovnání nanášek proteinů. Byly oskenovány a obraz použit pro další vyhodnocení.
- Poté byly membrány inkubovány v blokovacím pufru po dobu 30 minut.
- Následně byly membrány přeneseny do ředícího pufru s protilátkami a inkubovány přes noc při 4 °C. Použité protilátky i příslušné ředění je zpracováno v Tabulka 8.
- Druhý den byly slity primární protilátky a membrány promyty promývacím pufrem 3x 10 minut.
- Dále byly inkubovány po dobu 1 h v ředícím pufru se sekundárními protilátkami značenými křenovou peroxidázou.
- Následně byly membrány opět promyty 3x 10 minut promývacím pufrem.
- Poté byly inkubovány po dobu jedné minuty se substrátem pro křenovou peroxidázu (Pierce SuperSignal West Dura).
- Membrány byly osušeny filtračním papírem a vloženy do vyvolávací kazety.

12. Za tmy byl na membrány přiložen film a exponován po různě dlouhou dobu v závislosti na typu použité protilátky.

13. Film byl vyvolán v přístroji Optimax (Fomei) a následně vyhodnocen v programu ImageJ.

Tabulka 8: Použité primární a sekundární protilátky a jejich ředění

primární protilátka	šarže	ředění	sekundární protilátka	ředění
A1-R	sc-28995	2000x	anti-rabbit	40 000x
A2A-R	sc-13937	2000x	anti-rabbit	40 000x
A2B-R	sc-28996	5000x	anti-rabbit	40 000x
A3-R	sc-13938	5000x	anti-rabbit	40 000x
ENT1	ANT-051	10000x	anti-rabbit	40 000x
ENT2	ANT-052	10000x	anti-rabbit	40 000x
CNT2	ANT-062	10000x	anti-rabbit	40 000x
CD71	sc-9099	1000x	anti-rabbit	40 000x
kaveolin	sc-894	10000x	anti-rabbit	40 000x
G _{αi-2}	sc-7276	5000x	anti-rabbit	40 000x
G _{αs}	sc-135914	5000x	anti-mouse (sc-2380)	20 000x
AC V/VI	sc-590	1000x	anti-rabbit	40 000x

sc = Santa Cruz Biotechnology, ANT = Alomone Labs, anti-rabbit = anti-rabbit IgG Horseradish peroxidase-linked (from donkey)

8.6. Analýza a vyhodnocení výsledků

Analýza dat byla prováděna minimálně ze tří nezávislých pokusů. Jednotlivé vyvolané filmy byly oskenovány a vyhodnoceny pomocí programu ImageJ. Hodnoty získané denzity byly normalizovány vydělením průměrnou hodnotou exprese na daném filmu. Grafy byly vytvořeny a vyhodnoceny v programu GraphPad Prism.

Pro určení statistické významnosti byly použity jednofaktorová i dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) a Dunnettův test.

9. Výsledky

Pomocí metod SDS-PAGE a Western blottingu byla studována exprese adenosinových receptorů a transportérů v srdeční tkáni potkanů adaptovaných za různých podmínek – N (normoxie, kontrolní skupina), CNH (kontinuální normobarická hypoxie, 24 h v 10% O₂ po dobu 3 týdnů) a INH/R (intermitentní normobarická hypoxie, 23 h v 10% O₂ a 1 h v normoxii po dobu 3 týdnů). Bylo porovnáno relativní množství adenosinových receptorů a transportérů ve vzorcích hrubých membrán levých a pravých komor myokardu potkanů mezi jednotlivými adaptovanými skupinami. Také bylo srovnáno celkové množství receptoru v pravých a levých komorách.

Kromě vzorků hrubých membrán byly izolovány také membránové mikrodomény. Pro izolaci byly použity dvě metody – solubilizace s Tritonen X-100 v 2% koncentraci a solubilizace s 1M Na₂CO₃. Pak byla porovnána distribuce jednotlivých receptorů a transportérů v raftové nebo neraftové části membrány.

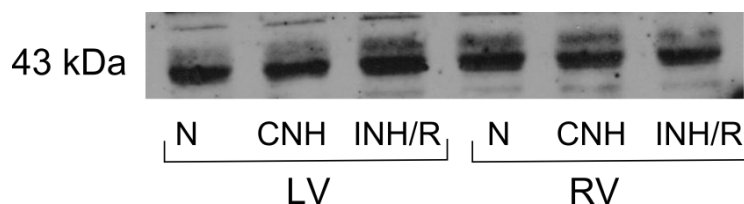
9.1. Hrubé membrány

Ve vzorcích hrubých membrán se podařilo detekovat všechny čtyři adenosinové receptory a u všech získat alespoň tři hodnotitelné výsledky.

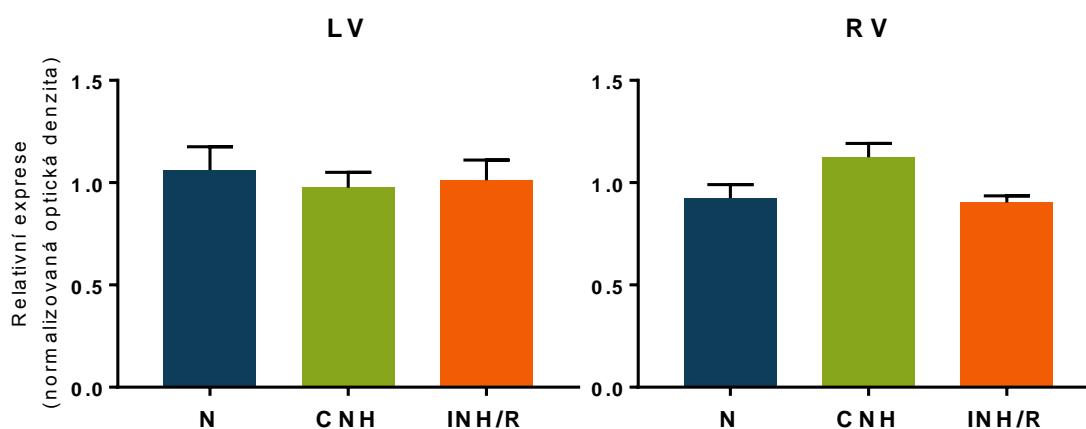
9.1.1. Exprese receptoru A₁

Pomocí specifických protilátek byl detekován adenosinový receptor A₁ ve vzorcích pravých i levých komor všech adaptovaných skupin. Zjištěná molekulová hmotnost receptoru odpovídá přibližně 43 kDa (Obr. 5).

Nebyl detekován statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami adaptace ani mezi levou a pravou komorou myokardu (Graf 1).



Obr. 5 Ukázka exprese receptoru A₁ ve vzorcích hrubých membrán levé (LV) a pravé (RV) komory myokardu. N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

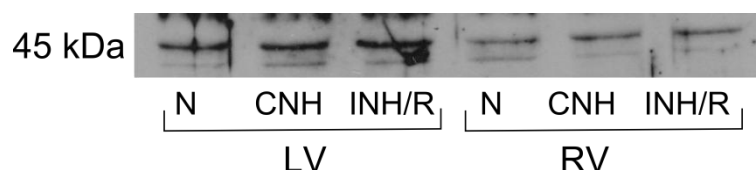


Graf 1 Porovnání exprese receptoru A₁ ve vzorcích hrubých membrán levé (LV) a pravé (RV) komory myokardu. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± S.E.M. ze tří nezávislých pokusů. N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

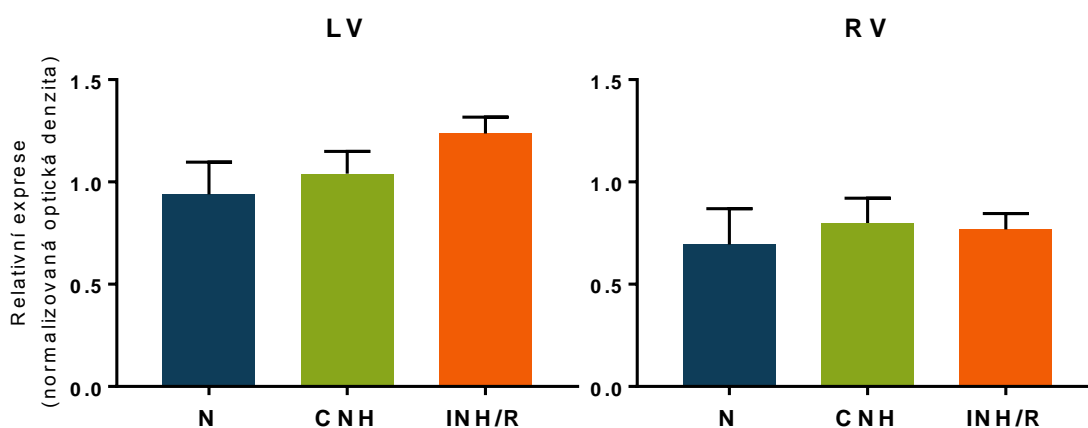
9.1.2. Exprese receptoru A_{2A}

Pomocí specifických protilátek byl detekován adenosinový receptor A_{2A} ve vzorcích pravých i levých komor všech adaptovaných skupin. Zjištěná molekulová hmotnost receptoru odpovídá přibližně 45 kDa (Obr. 6).

Mezi jednotlivými skupinami adaptace v levé a pravé komoře nebyl detekován statisticky významný rozdíl (Graf 2). Avšak celkové množství receptoru ve vzorcích pravé komory bylo signifikantně nižší než v komoře levé ($p < 0,05$).



Obr. 6 Ukázka exprese receptoru A_{2A} ve vzorcích hrubých membrán levé (LV) a pravé (RV) komory. N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

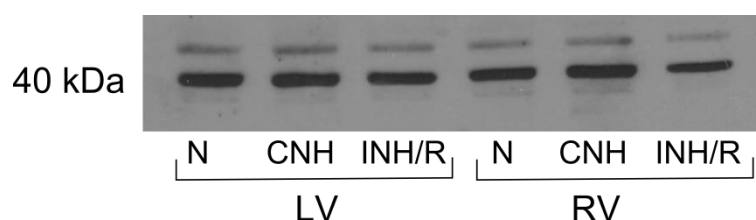


Graf 2 Porovnání exprese receptoru A_{2A} ve vzorcích hrubých membrán v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm S.E.M. ze čtyř nezávislých pokusů. N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

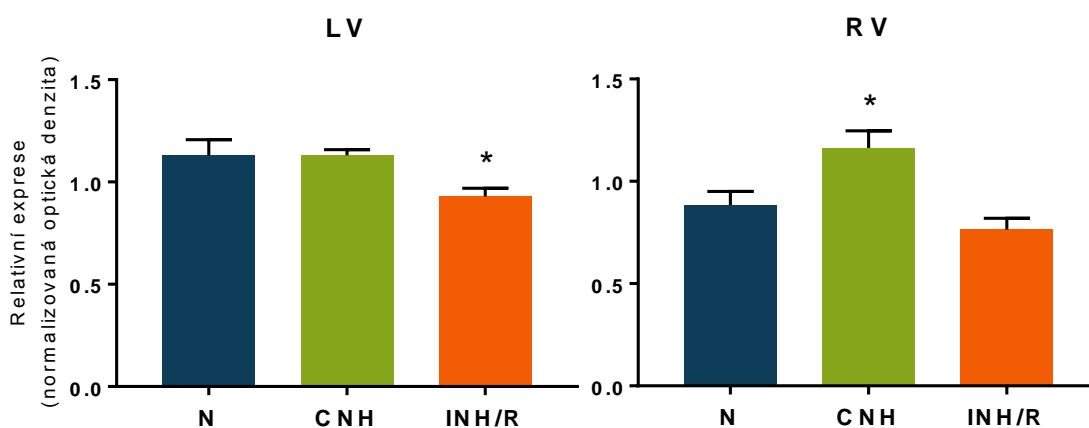
9.1.3. Expresa receptoru A_{2B}

Pomocí specifických protilátek byl detekován adenosinový receptor A_{2B} ve vzorcích pravých i levých komor všech adaptovaných skupin. Zjištěná molekulová hmotnost receptoru odpovídá přibližně 40 kDa (Obr. 7).

U receptoru A_{2B} byly detekovány statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami adaptace. V levé komoře byl signifikantní pokles množství receptoru ve skupině INH/R ve srovnání s kontrolní skupinou (N). V pravé komoře pak došlo k nárůstu množství receptoru u skupiny CNH proti N (Graf 3).



Obr. 7 Ukázka exprese receptoru A_{2B} ve vzorcích hrubých membrán v levé (LV) a pravé (RV) komoře. N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

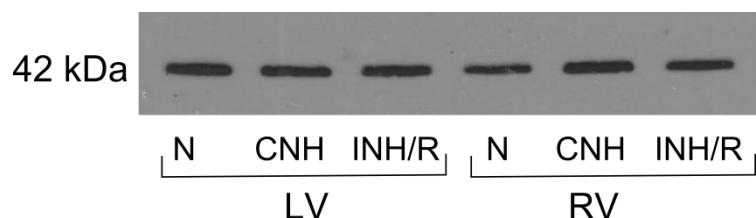


Graf 3 Expresa receptoru A_{2B} ve vzorcích hrubých membrán v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± S.E.M. ze čtyř nezávislých pokusů. N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

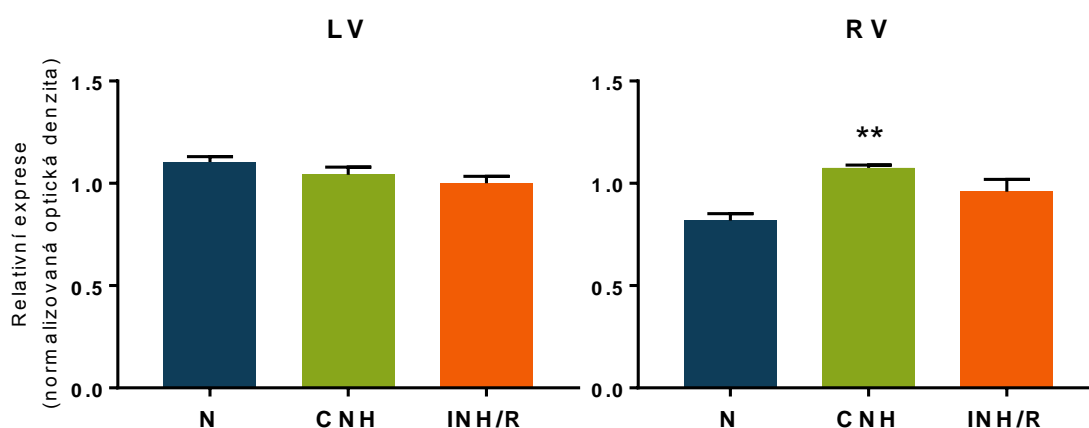
9.1.4. Expresa receptoru A₃

Pomocí specifických protilátek byl detekován adenosinový receptor A₃ ve vzorcích pravých i levých komor všech adaptovaných skupin. Zjištěná molekulová hmotnost receptoru odpovídá přibližně 42 kDa (Obr. 8).

U vzorků levé komory nebyly mezi jednotlivými skupinami adaptace detekovány statisticky významné rozdíly v množství receptoru. U vzorků pravé komory byl signifikantní nárůst množství receptoru u skupiny CNH v porovnání s kontrolou (Graf 4). U kontrolní skupiny (N) bylo signifikantně menší množství receptoru v pravé komoře proti levé. U ostatních skupin se tento rozdíl neukázal.



Obr. 8 Expresa receptoru A₃ ve vzorcích hrubých membrán v levé (LV) a pravé (RV) komoře. N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

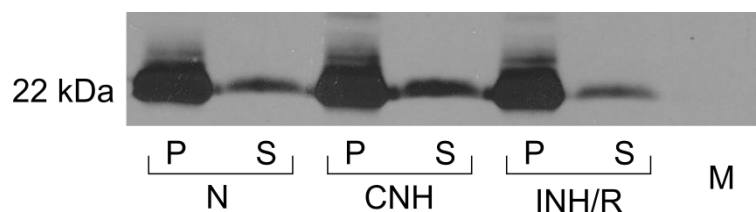


Graf 4 Expresa receptoru A₃ ve vzorcích hrubých membrán v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± S.E.M. z pěti nezávislých pokusů. N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

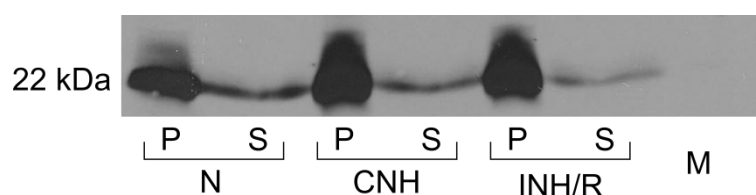
9.2. Membránové mikrodomény

Byly vytvořeny dva odlišné vzorky membránových mikrodomén – solubilizací s detergentem Tritonem X-100 v 2% koncentraci nebo 1M Na₂CO₃.

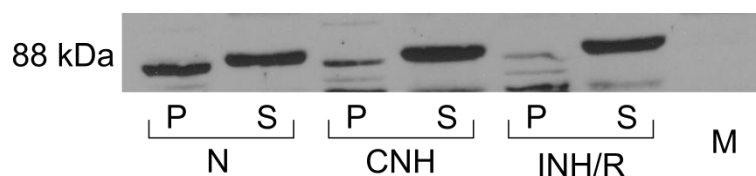
Jako markery jednotlivých frakcí byly použity kaveolin-1 pro frakci lipidových raftů (Obr. 9 a Obr. 10) a CD71 pro většinovou (neraftovou) část membrány (Obr. 11).



Obr. 9 Expres kaveolinu-1 ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s detergentem Triton X-100 v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii, M – vzorek kortexu potkaního mozku



Obr. 10 Expres kaveolinu-1 ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Na₂CO₃ v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii, M – vzorek kortexu potkaního mozku

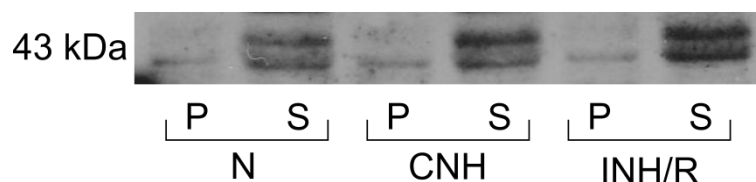


Obr. 11 Expres membránového proteinu CD71 ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s detergentem Triton X-100 v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii, M – vzorek kortexu potkaního mozku

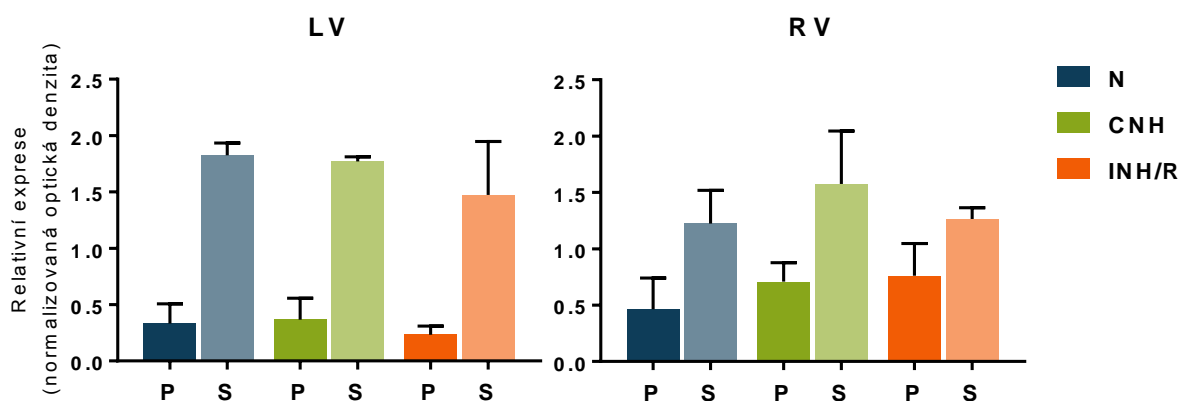
9.2.1. Expresa receptoru A₁

Ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Tritonem X-100 byl pomocí protilátek detekován receptor A₁ s molekulovou hmotností okolo 43 kDa (Obr. 12).

Větší množství receptoru bylo detekováno ve většinové (neraftové) frakci membrány (S) a to u všech skupin adaptace v levé i pravé komoře. V levé komoře bylo množství ve frakci S signifikantně vyšší než ve frakci P. V pravé komoře se rozdíly mezi frakcemi více vyrovnaly a rozdíl tam není statisticky významný. Mezi jednotlivými skupinami adaptace pak nebyl detekován žádný signifikantní rozdíl (Graf 5).

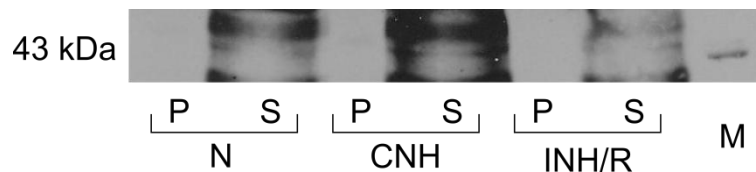


Obr. 12 Expresa receptoru A₁ ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s detergentem Triton X-100 v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii



Graf 5 Porovnání exprese receptoru A₁ ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s detergentem Triton X-100 v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± S.E.M. ze tří nezávislých pokusů. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

Z vzorků získaných solubilizací s Na_2CO_3 se pro receptor A_1 nepodařilo získat hodnotitelné výsledky. Imunochemický signál tohoto receptoru byl však zřetelně silnější v solubilní frakci (Obr. 13).

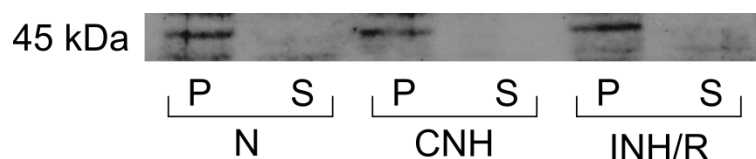


Obr. 13 Exprese receptoru A_1 ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Na_2CO_3 v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii, M – vzorek kortexu potkaního mozku

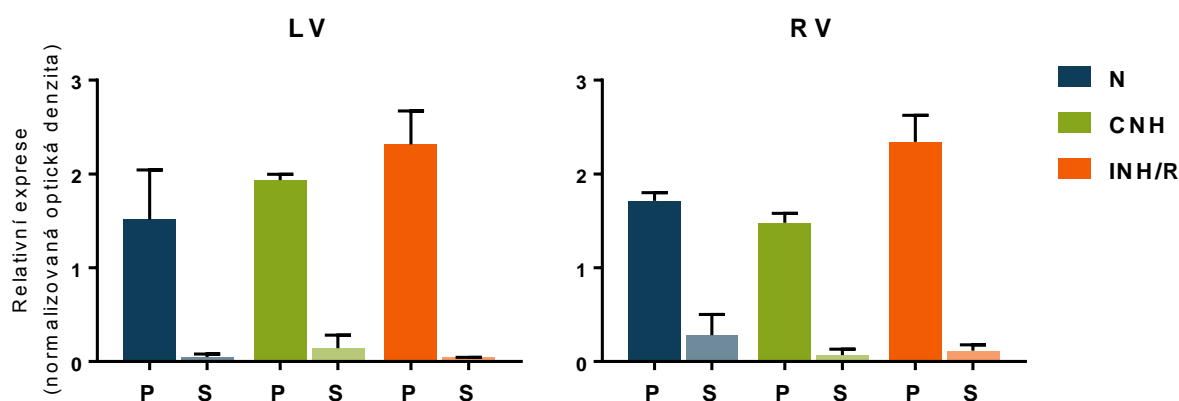
9.2.2. Expresa receptoru A_{2A}

Ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Tritonem X-100 byl pomocí protilátek detekován receptor A_{2A} s molekulovou hmotností okolo 45 kDa (Obr. 14).

Téměř veškerý signál se nacházel v raftové části membrány (P). A to u všech skupin adaptace stejně jako v levé i pravé komoře. Mezi jednotlivými skupinami adaptace ani mezi komorami nebyl detekován statisticky významný rozdíl (Graf 6).

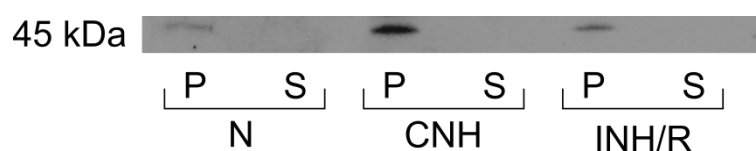


Obr. 14 Expresa receptoru A_{2A} ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s detergentem Triton X-100 v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

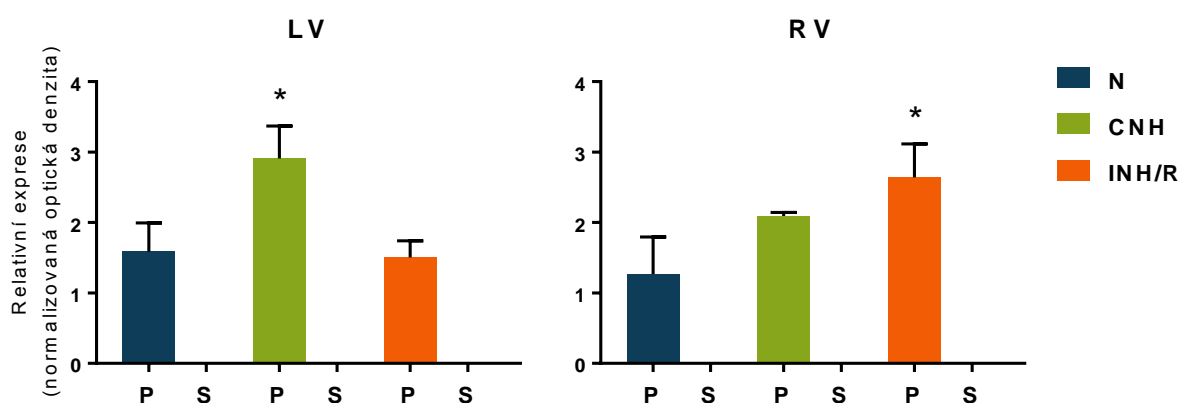


Graf 6 Porovnání exprese receptoru A_{2A} ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s detergentem Triton X-100 v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± S.E.M. ze dvou nezávislých pokusů. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

Také u vzorků získaných solubilizací s Na_2CO_3 byl detekován receptor $\text{A}_{2\text{A}}$ (Obr. 15). Zde byl signál zřetelný pouze v raftové frakci membrány (P). V levé komoře se ukázal signifikantní nárůst množství receptoru ve skupině CNH ve srovnání s kontrolou (N). V pravé komoře byl pak statisticky významný nárůst u skupiny INH/R v porovnání s kontrolní skupinou (N) (Graf 7).



Obr. 15 Expresa receptoru $\text{A}_{2\text{A}}$ ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Na_2CO_3 v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

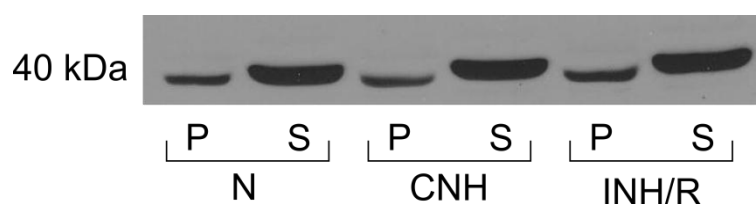


Graf 7 Porovnání exprese receptoru $\text{A}_{2\text{A}}$ ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Na_2CO_3 v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm S.E.M. ze tří nezávislých pokusů. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

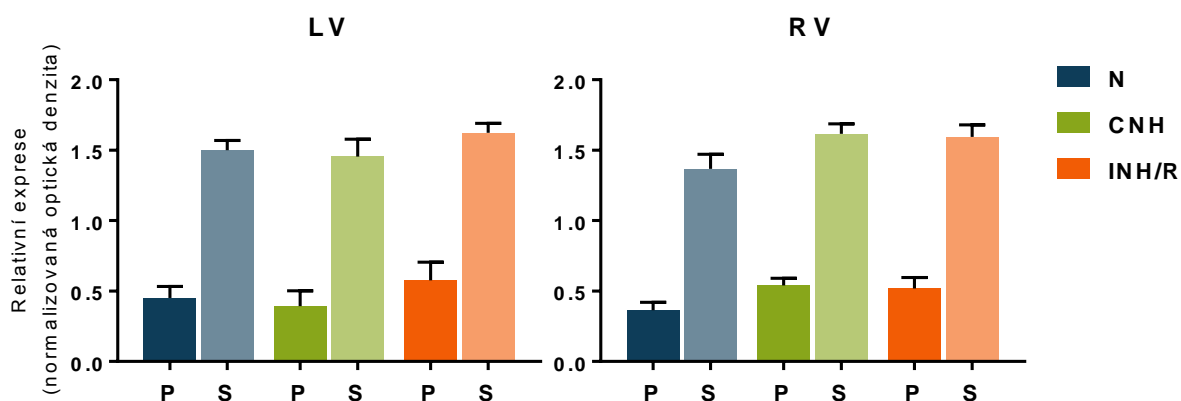
9.2.3. Expresa receptoru A_{2B}

Ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Tritonem X-100 byl pomocí protilátek detekován receptor A_{2B} s molekulovou hmotností okolo 40 kDa (Obr. 16).

Signifikantně větší množství receptoru bylo detekováno ve většinové (neraftové) frakci membrány (S), a to u všech skupin adaptace. Mezi jednotlivými skupinami pak nebyl nalezen signifikantní rozdíl v distribuci tohoto receptoru (Graf 8). Stejně tak nebyl zjištěn rozdíl mezi levou a pravou komorou myokardu.

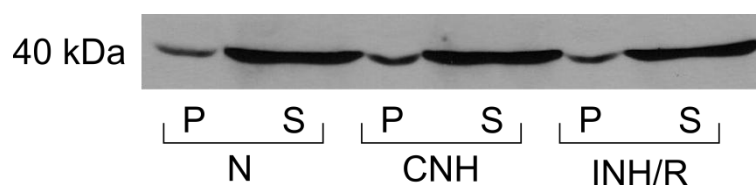


Obr. 16 Expresa receptoru A_{2B} ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s detergentem Triton X-100 v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

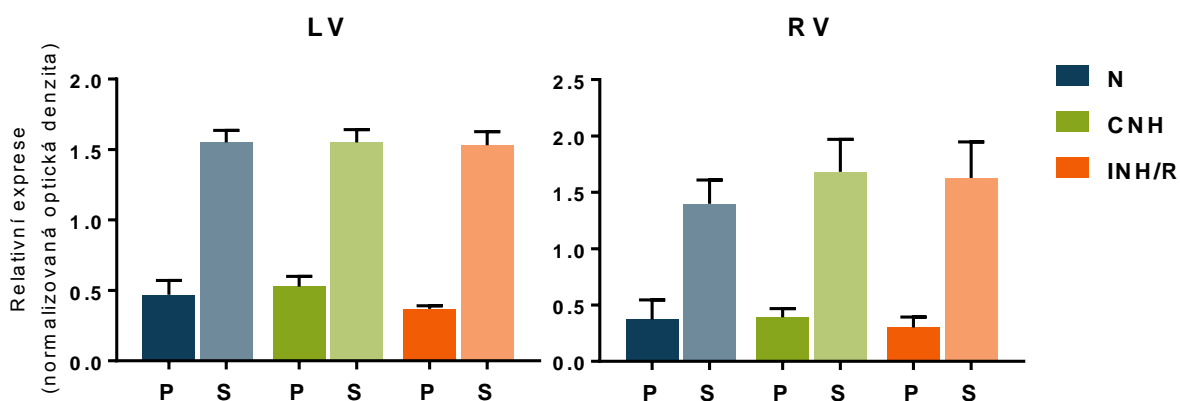


Graf 8 Expresa receptoru A_{2B} ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s detergentem Triton X-100 v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± S.E.M. ze čtyř nezávislých pokusů. N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány)

Výsledky vyhodnocení vzorků získaných solubilizací s Na_2CO_3 (Graf 9) potvrdily výsledky získané u vzorků solubilizovaných s Tritonem (Graf 8). Receptor se také vyskytoval spíše ve většinové (neraftové) části membrány (S) s žádnými statisticky významnými rozdíly mezi jednotlivými skupinami adaptace ani mezi levými a pravými komorami.



Obr. 17 Expresce receptoru A_{2B} ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Na_2CO_3 v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

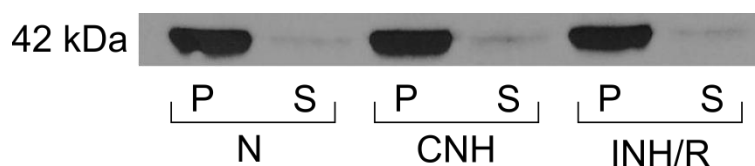


Graf 9 Expresce receptoru A_{2B} ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Na_2CO_3 v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm S.E.M. ze čtyř nezávislých pokusů. N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány)

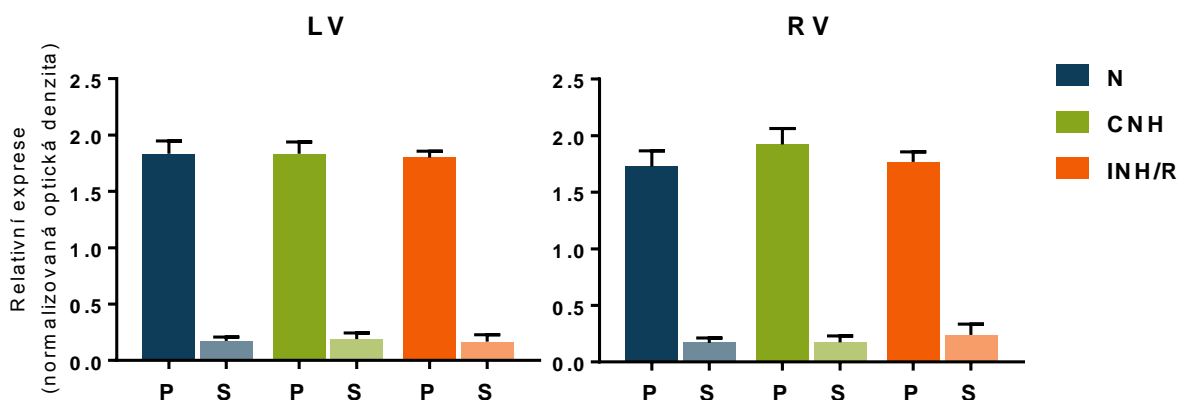
9.2.4. Expresa receptoru A₃

Ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Tritonem X-100 byl pomocí protilátek detekován receptor A₃ s molekulovou hmotností okolo 42 kDa (Obr. 18).

Stejně jako u receptoru A_{2A} bylo detekováno signifikantně větší množství receptoru v raftové frakci membrány (P). Rozdíly mezi jednotlivými skupinami adaptace ani mezi levou a pravou komorou zjištěny nebyly (Graf 10).

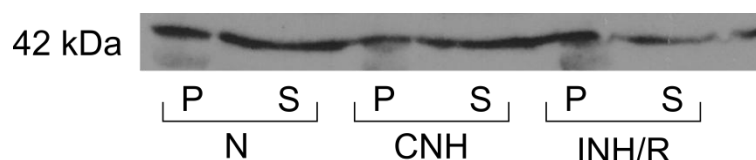


Obr. 18 Expresa receptoru A₃ ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s detergentem Triton X-100 v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

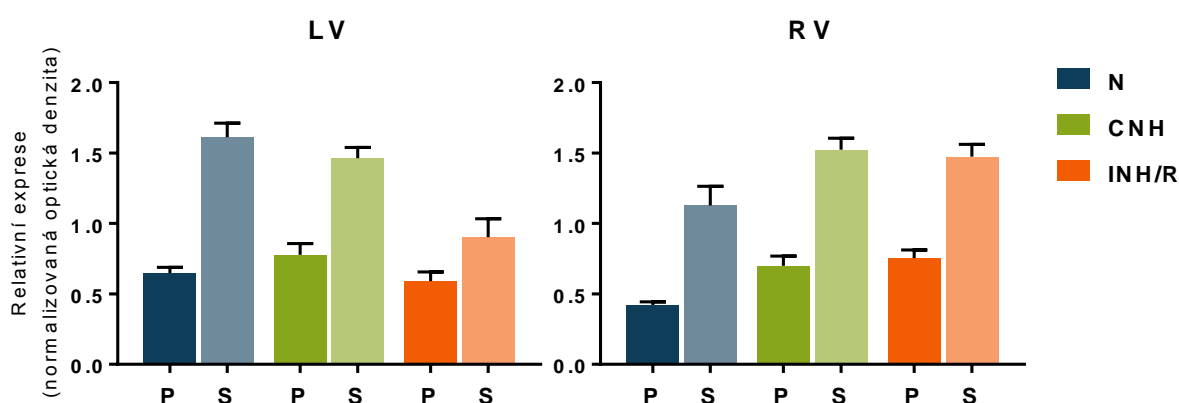


Graf 10 Porovnání exprese receptoru A₃ ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s detergentem Triton X-100 v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± S.E.M. z šesti nezávislých pokusů. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

Na rozdíl od vzorků solubilizovaných s Tritonem X-100 bylo u vzorků inkubovaných s Na_2CO_3 (Obr. 19) zjištěno větší množství receptoru ve většinové (neraftové) části membrány (S). Tento rozdíl byl statisticky významný u všech skupin kromě skupiny INH/R v levé komoře myokardu (Graf 11).



Obr. 19 Expresce receptoru A₃ ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Na_2CO_3 v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

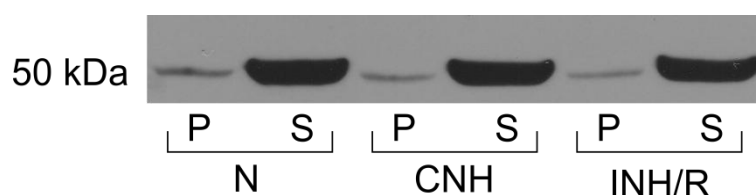


Graf 11 Porovnání exprese receptoru A₃ ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Na_2CO_3 v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm S.E.M. ze čtyř nezávislých pokusů. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

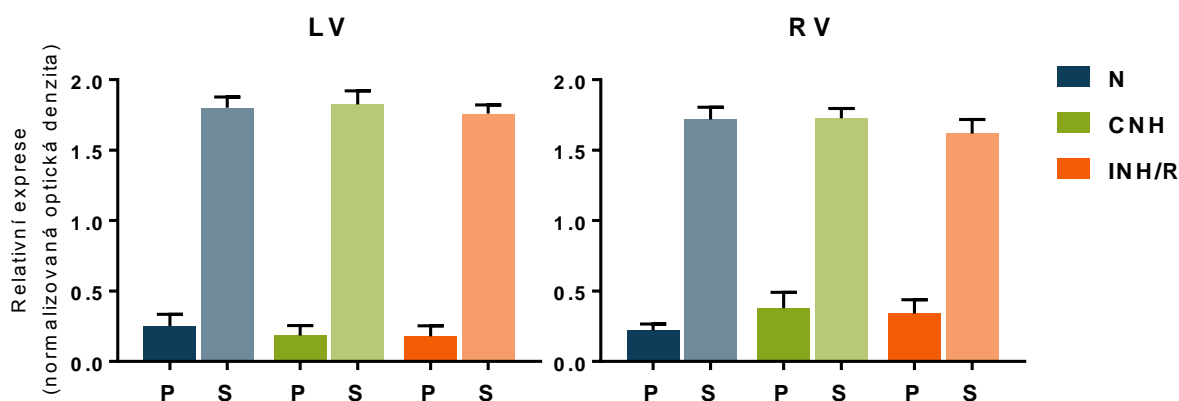
9.2.5. Expresa transportéru ENT1

Pomocí specifických protilátek byl detekován nukleosidový transportér ENT1 ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Tritonem X-100 v pravých i levých komorách všech adaptovaných skupin. Zjištěná molekulová hmotnost receptoru odpovídá přibližně 50 kDa (Obr. 20).

Signifikantně větší množství transportéru bylo zjištěno ve většinové (neraftové) frakci membrány (S). Mezi jednotlivými skupinami adaptace ani mezi pravými a levými komorami nebyl detekován statisticky významný rozdíl (Graf 12).

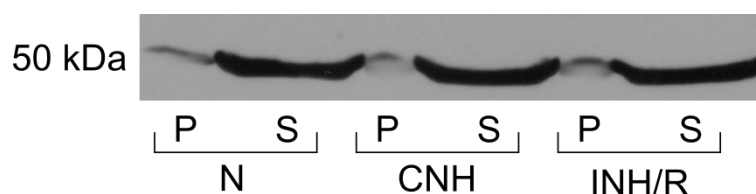


Obr. 20 Expresa transportéru ENT1 ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s detergentem Triton X-100 v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

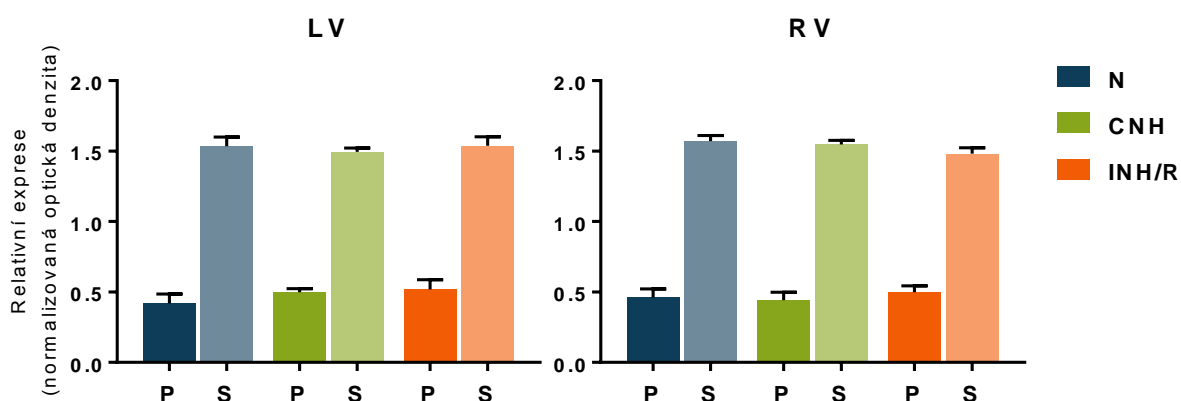


Graf 12 Porovnání exprese transportéru ENT1 ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s detergentem Triton X-100 v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm S.E.M. ze čtyř nezávislých pokusů. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

Výsledky vyhodnocení vzorků získaných solubilizací s Na_2CO_3 (Obr. 21) se shodují s výsledky vyhodnocení vzorků získaných solubilizací s Tritonem X-100. I zde je signifikantně větší množství transportéru ve většinové (neraftové) frakci membrány (S) s žádnými rozdíly mezi jednotlivými skupinami adaptace ani mezi pravými a levými komorami (Graf 13).



Obr. 21 Expres transportéru ENT1 ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Na_2CO_3 v pravé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

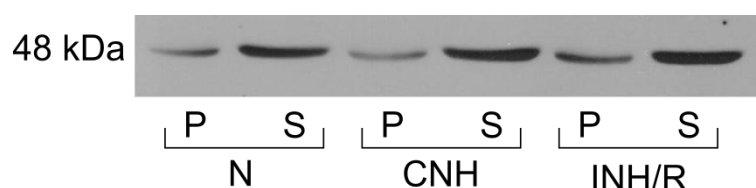


Graf 13 Porovnání exprese transportéru ENT1 ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Na_2CO_3 v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm S.E.M. ze tří nezávislých pokusů. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

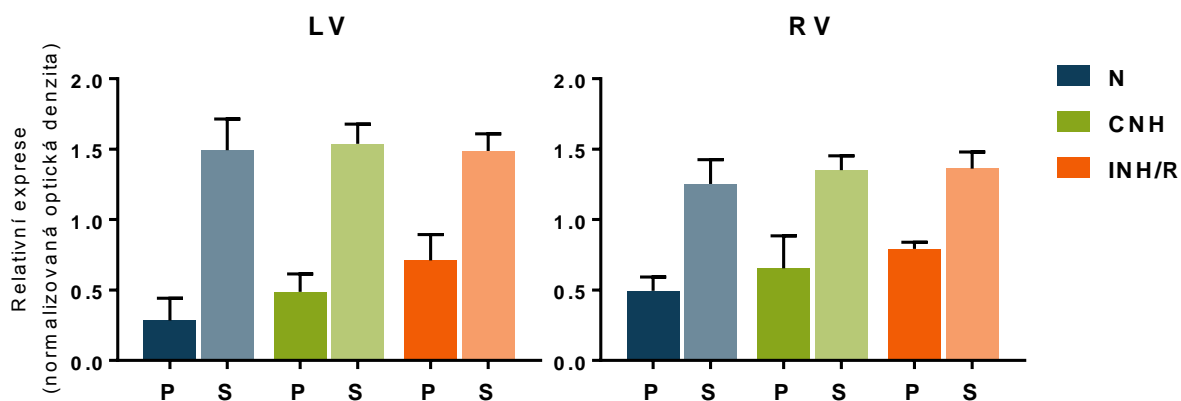
9.2.6. Expresa transportéru ENT2

Pomocí specifických protilátek byl detekován nukleosidový transportér ENT2 ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Tritonem X-100 v pravých i levých komorách všech adaptovaných skupin. Zjištěná molekulová hmotnost receptoru odpovídá přibližně 48 kDa (Obr. 20).

Signifikantně větší množství transportéru bylo zjištěno ve většinové (neraftové) frakci membrány (S). Mezi jednotlivými skupinami adaptace ani mezi pravými a levými komorami nebyl detekován statisticky významný rozdíl (Graf 14).

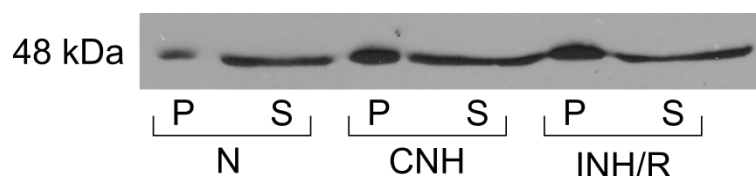


Obr. 22 Expresa transportéru ENT2 ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s detergentem Triton X-100 v pravé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

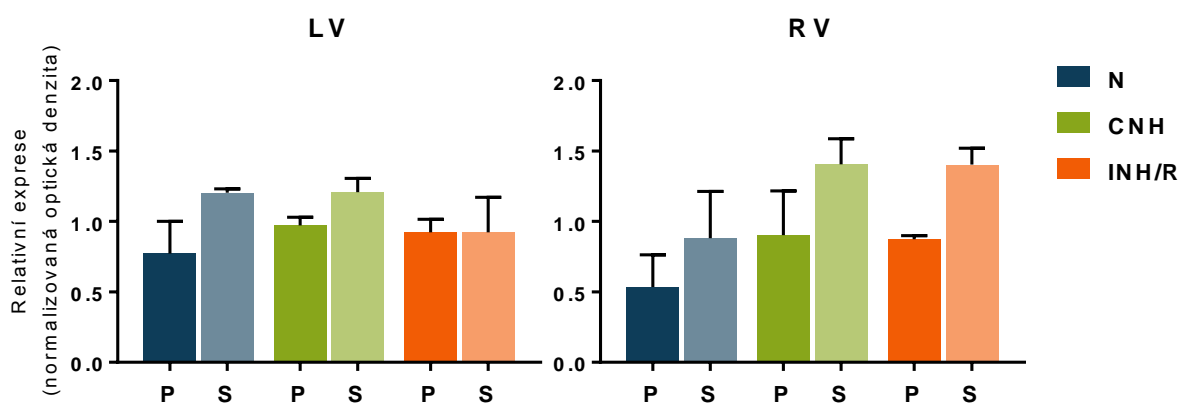


Graf 14 Porovnání exprese transportéru ENT2 ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s detergentem Triton X-100 v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm S.E.M. ze tří nezávislých pokusů. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

U vzorků získaných solubilizací s Na_2CO_3 (Obr. 23) se neukázaly žádné statisticky významné rozdíly mezi frakcemi, skupinami ani komorami (Graf 15).



Obr. 23 Expresa transportéru ENT2 ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Na_2CO_3 v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

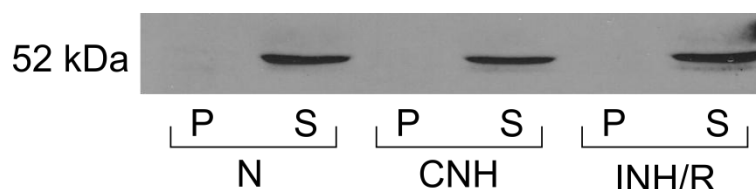


Graf 15 Porovnání exprese transportéru ENT2 ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Na_2CO_3 v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm S.E.M. ze tří nezávislých pokusů. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

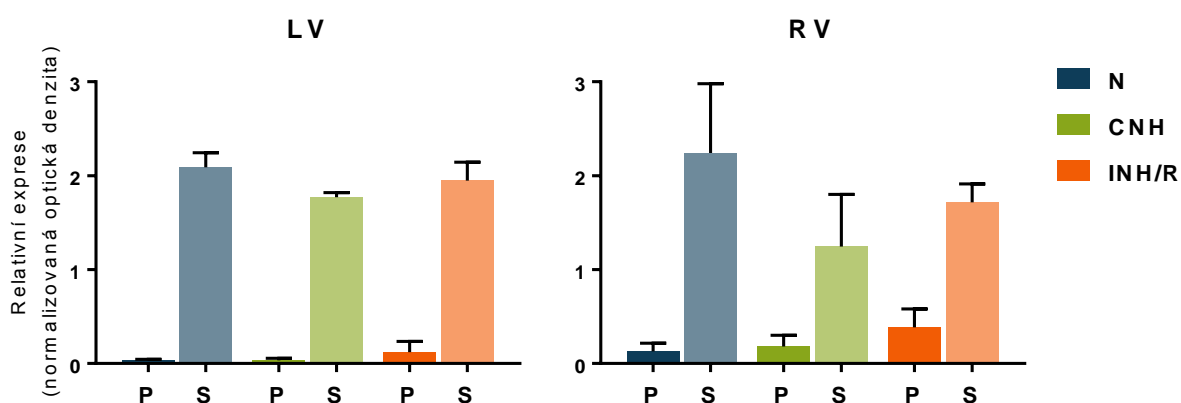
9.2.7. Expresa transportéru CNT2

Pomocí specifických protilátek byl detekován nukleosidový transportér ENT1 ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Tritonem X-100 v pravých i levých komorách všech adaptovaných skupin. Zjištěná molekulová hmotnost receptoru odpovídá přibližně 50 kDa (Obr. 20).

U levé komory bylo zjištěno signifikantně větší množství transportéru ve většinové (neraftové) frakci membrány (S). V pravé komoře bylo také větší množství transportéru ve většinové (neraftové) frakci membrány (S), statisticky významný rozdíl byl však pouze u kontrolní skupiny (N). Mezi jednotlivými skupinami adaptace ani mezi pravými a levými komorami nebyl detekován signifikantní rozdíl (Graf 16).

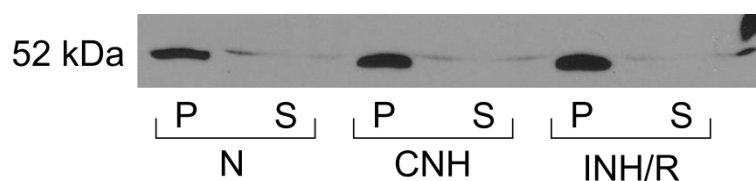


Obr. 24 Expresa transportéru CNT2 ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s detergentem Triton X-100 v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

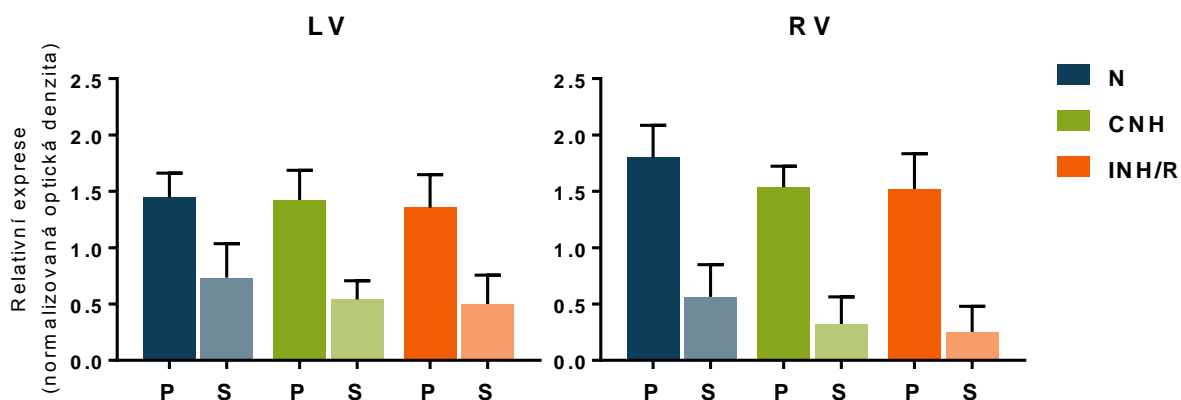


Graf 16 Porovnání exprese transportéru CNT2 ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s detergentem Triton X-100 v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm S.E.M. ze tří nezávislých pokusů. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

Výsledky vyhodnocení vzorků získaných solubilizací s Na_2CO_3 jsou opačné než výsledky vyhodnocení vzorků získaných solubilizací s Tritonem X-100. Většina signálu se nachází v raftové (P) frakci membrány (Obr. 25). Rozdíl je však signifikantní pouze u vzorků pravé komory. Mezi jednotlivými skupinami adaptace nebyl detekován statisticky významný rozdíl (Graf 17).



Obr. 25 Expres transportéru CNT2 ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Na_2CO_3 v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

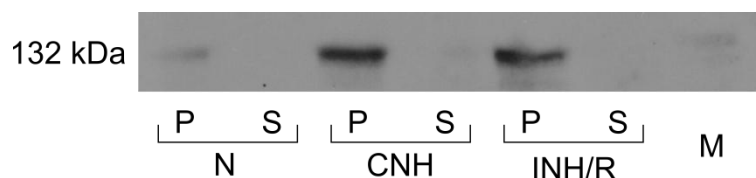


Graf 17 Porovnání exprese transportéru CNT2 ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Na_2CO_3 v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm S.E.M. ze čtyř nezávislých pokusů. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii

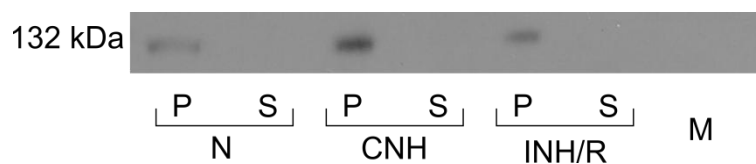
9.2.8. Expresa dalších proteinů

Pro doplnění byly vytvořeny také imunoblotty znázorňující distribuci dalších proteinů důležitých pro adenosinergní signalizaci.

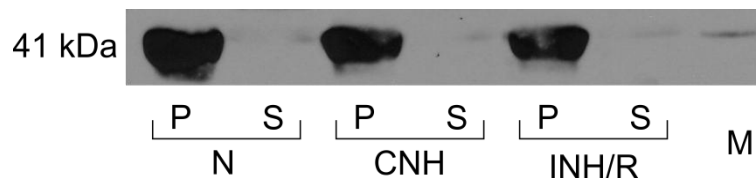
Z obrázků je zřejmé, že Gαs (Obr. 30) i Gαi (Obr. 28 a Obr. 29) proteiny, stejně jako AC (Obr. 26 a Obr. 27) lokalizují v membránových mikrodoménách (P).



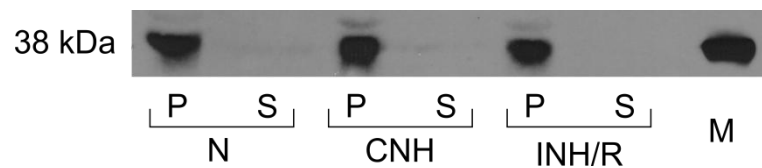
Obr. 26 Expresa AC ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s detergentem Triton X-100 v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii, M – vzorek kortexu potkaního mozku



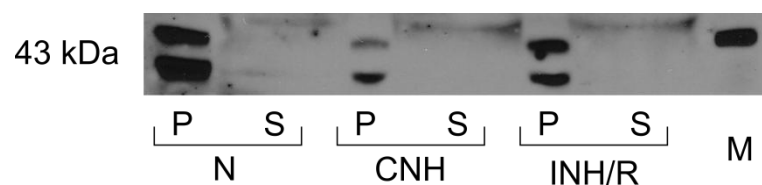
Obr. 27 Expresa AC ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Na_2CO_3 v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii, M – vzorek kortexu potkaního mozku



Obr. 28 Expresa Gαi₂-proteinu ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s detergentem Triton X-100 v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii, M – vzorek kortexu potkaního mozku



Obr. 29 Expresse $G\alpha_i3$ -proteinu ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Na_2CO_3 v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii, M – vzorek kortexu potkaního mozku



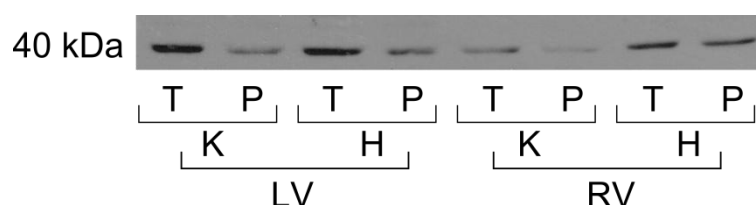
Obr. 30 Expresse $G\alpha_s$ -proteinu ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Na_2CO_3 v levé komoře myokardu. P – pelet (lipidové rafty), S – supernatant (neraftová frakce membrány), N – vzorek kontrolní skupiny, CNH – vzorek skupiny chované v kontinuální normobarické hypoxii, INH – vzorek skupiny chované v intermitentní normobarické hypoxii, M – vzorek kortexu potkaního mozku

9.3. Výsledky předběžného pokusu zaměřeného na vliv ischemie

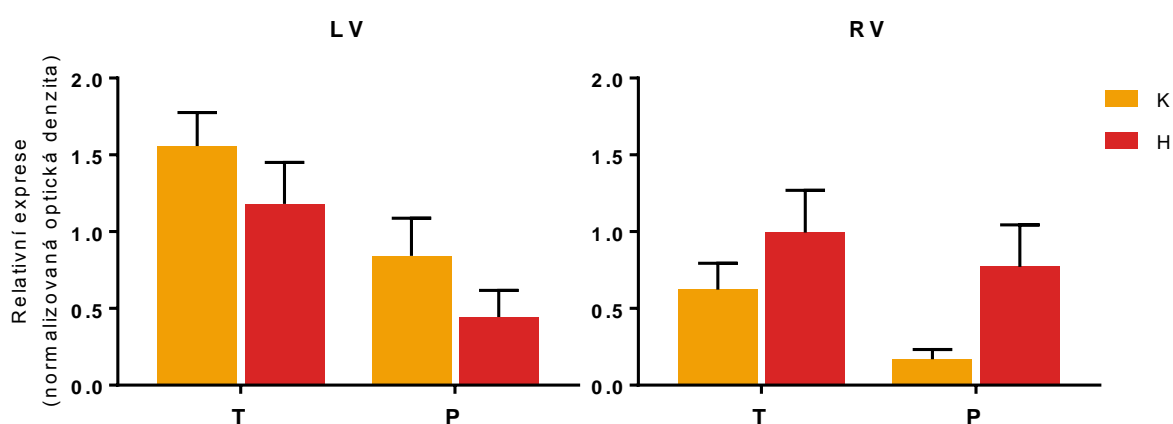
Pomocí metod SDS-PAGE a Western blottingu byla studována exprese adenosinových receptorů v srdeční tkáni potkanů adaptovaných na intermitentní hypoxii (8 h, 10% O₂) (H) a kontrolních potkanů (K). U všech srdcí byla provedena ischemie (10 min) a následná perfúze (30 min). Ta byla provedena pomocí hydrostatického tlaku (T) z nádoby zavěšené nad srdcem nebo pomocí pumpy (P).

9.3.1. Exprese receptoru A_{2B}

Pomocí specifických protilátek byl detekován adenosinový receptor A_{2B} ve vzorcích hrubých membrán pravých i levých komor (Obr. 31). Mezi jednotlivými skupinami se ukázaly rozdíly, i když žádný nebyl statisticky významný (Graf 18).



Obr. 31 Exprese receptoru A_{2B} ve vzorcích hrubých membrán v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. T – perfúze tlakem, P – perfúze pumpou, K – kontrolní skupina, H – skupina adaptovaná na hypoxii

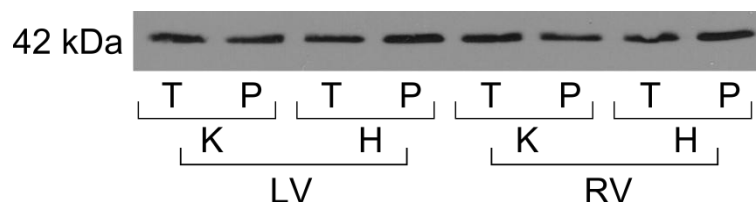


Graf 18 Porovnání exprese receptoru A_{2B} ve vzorcích hrubých membrán v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± S.E.M. ze čtyř nezávislých pokusů. T – perfúze tlakem, P – perfúze pumpou, K – kontrolní skupina, H – skupina adaptovaná na hypoxii

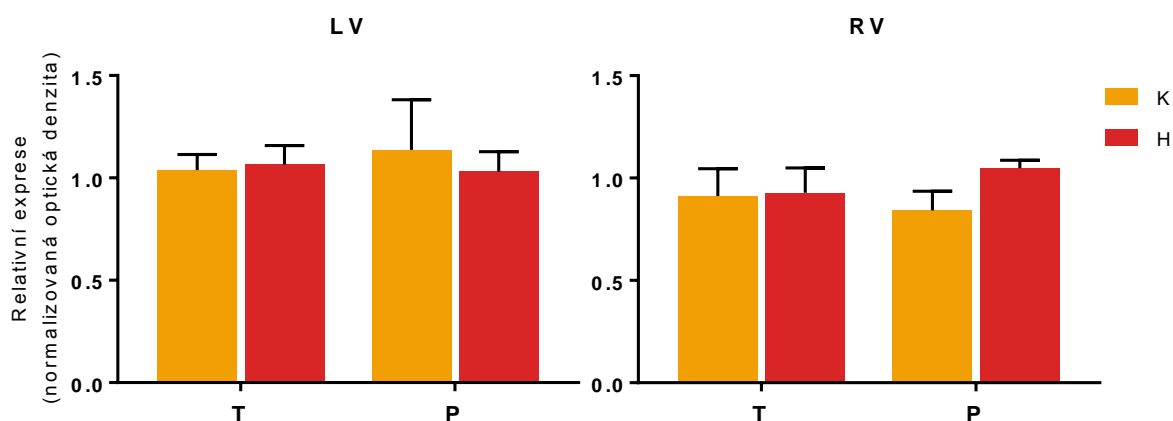
9.3.1. Expresa receptoru A₃

Pomocí specifických protilátek byl detekován adenosinový receptor A₃ ve vzorcích pravých i levých komor všech skupin (Obr. 32).

U distribuce tohoto receptoru se neukázaly žádné signifikantní rozdíly (Graf 19).



Obr. 32 Expresa receptoru A_{2B} ve vzorcích hrubých membrán v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. T – perfúze tlakem, P – perfúze pumpou, K – kontrolní skupina, H – skupina adaptovaná na hypoxii



Graf 19 Porovnání exprese receptoru A₃ ve vzorcích hrubých membrán v levé (LV) a pravé (RV) komoře myokardu. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± S.E.M. ze čtyř nezávislých pokusů. T – perfúze tlakem, P – perfúze pumpou, K – kontrolní skupina, H – skupina adaptovaná na hypoxii

10. Diskuse

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda dochází ke změnám v adenosinergním signálním systému během adaptace na chronickou hypoxii. Je totiž známo, že adaptace na chronickou hypoxii je vedle ischemického preconditioningu jedním z mechanismů vedoucím ke kardioprotekci při ischemickém poškození. Ischemicko-reperfúzní poškození srdce je nejčastější příčinou úmrtí v západním světě (Murray and Lopez, 1997). Proto je výzkum a pochopení mechanismů vedoucích k jeho protekci zásadní. Ačkoliv byly navrženy některé faktory hrající roli v kardioprotekci adaptací na chronickou hypoxii, přesné mechanismy ještě nebyly zcela vysvětleny.

Adenosin, jakožto produkt degradace ATP, je přítomný v celém těle. Jeho hladina a tedy i význam roste za zvýšené spotřeby energie a nedostatku kyslíku. Prostřednictvím adenosinových receptorů (A_1 , A_{2A} , A_{2B} a A_3) pak jeho signalizace vede ke snížení energetických nároků buněk a zvýšení dodávky metabolitů díky adenosinem indukované vasodilataci (Kitakaze et al., 1999). Také je známo, že adenosinergní systém se účastní kardioprotekce ischemických preconditioningem. Protože bylo objeveno, že tyto dva mechanismy kardioprotekce alespoň částečně sdílejí podobné signální dráhy (Neckár et al., 2002), dá se předpokládat i role adenosinu v adaptaci na chronickou hypoxii. Ta však zatím nebyla příliš studována.

K našemu experimentu byly použity dvě skupiny potkanů adaptovaných po dobu 3 týdnů za různých hypoxických podmínek (CNH, INH/R) a jedna skupina kontrolních potkanů (N). Skupina CNH byla chovaná v kontinuální normobarické hypoxii, tedy po celou dobu v 10% koncentraci kyslíku. Druhá skupina (INH/R) byla adaptovaná v intermitentní normobarické hypoxii. To znamená, že v hypoxii (10% O_2) byli 23 h denně a zbylou hodinu v normoxii. Kontrolní skupina byla chovaná v normoxii (Hahnova et al., 2016). Tyto formy adaptace byly vybrány na základě předchozí studie Neckáře et al. (2013), která uvádí, že u adaptace na chronickou hypoxii stačí 1 h reoxygenace denně pro zrušení kardioprotektivního účinku této adaptace. Podle tohoto modelu by pak adaptace u skupiny CNH měla působit protektivně, ale u skupiny INH/R nikoliv.

Pro porovnání množství receptorů u jednotlivých skupin adaptace byly použity vzorky hrubých membrán izolovaných z pravých i levých komor myokardu potkanů.

Během optimalizace byly vyzkoušeny různé protilátky v různých koncentracích. Pro samotné pokusy pak byly použity protilátky uvedené v Tabulka 8 s daným ředěním. Následně bylo provedeno mnoho opakování pokusů, aby byly získány alespoň tři hodnotitelné výsledky pro každý receptorový subtyp. To se podařilo a u některých subtypů bylo získáno dokonce větší množství hodnotitelných výsledků, což vedlo ke zvýšení statistické významnosti.

U receptoru A_1 nebyl detekován žádný statisticky významný rozdíl. I když u pravé komory můžeme sledovat tendenci k nárůstu množství receptoru u skupiny CNH. To by bylo ve shodě s literaturou, která ukazuje zvýšení exprese receptoru A_1 po chronické hypoxii činností transkripčního faktoru NF κ B (Hammond et al., 2004). I v našem experimentu by se možná tento rozdíl ukázal signifikantní, kdybychom provedli více opakování pokusu. U druhé skupiny adaptace (INH/R) stejně jako ve vzorcích levé komory se pak žádná změna neukazuje.

Jediný statisticky významný rozdíl u exprese receptoru A_{2A} byl mezi levou a pravou komorou. Celkové množství receptoru v pravé komoře bylo signifikantně nižší než v levé. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami adaptace se ale neukázaly. Literatura však popisuje nárůst množství receptoru při chronické hypoxii (Brown et al., 2011). A to činností transkripčního faktoru HIF2- α (Ahmad et al., 2009). My jsme sledovali pouze mírný, avšak ne statisticky významný, nárůst u skupiny INH/R v levé komoře v porovnání s kontrolní skupinou.

I u receptoru A_{2B} můžeme nalézt v literatuře zmínky o zvýšení jeho exprese při chronické hypoxii (Kong et al., 2006; Livermore and Nurse, 2013). Avšak stejně jako u receptorů A_1 a A_{2A} byly tyto studie prováděny pouze na buněčných liniích.

Receptor A_{2B} konečně ukázal statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami adaptace. Tyto rozdíly však byly odlišné v levé a pravé komoře. V levé komoře došlo k signifikantnímu poklesu množství receptoru u skupiny INH/R. U skupiny CNH bylo množství receptoru téměř totožné se skupinou kontrolní. V pravé komoře se naopak lišilo množství receptoru u skupiny CNH, kde došlo k signifikantnímu

nárůstu. U skupiny INH/R můžeme sledovat pouze mírný, avšak zdaleka ne statisticky významný, pokles. Naše výsledky tak potvrzují hypotézu, že receptor A_{2B} by se mohl uplatňovat v kardioprotekci adaptací na chronickou hypoxii. Víme totiž, že ze všech adenosinových receptorů, se nejvíce podílí na kardioprotekci ischemickým preconditioningem (Eckle et al., 2008; Kuno et al., 2007; Yang et al., 2010). Dále bylo zjištěno, že tyto mechanismy mohou sdílet stejné signální dráhy (Neckár et al., 2002). A naše výsledky, kdy došlo k opačnému efektu u kardioprotektivní adaptace (CNH) a neprotektivní adaptace (INH/R), tuto hypotézu dále potvrzují.

U receptoru A_3 nebyl v levé komoře detekován žádný statisticky významný rozdíl. Stejně tak není vidět ani žádná tendence ke změně. V pravé komoře však naopak došlo k nárůstu množství receptoru u obou skupin adaptace v porovnání s kontrolní skupinou. Pouze u skupiny CNH byl však tento rozdíl signifikantní. Dále také došlo k statisticky významnému poklesu množství receptoru A_3 u kontrolní skupiny v pravé komoře v porovnání s levou komorou. Tento rozdíl se neukázal u dalších skupin. Vzhledem k poměrně nedávnému objevení tohoto receptoru, nebyl prozatím v souvislosti s chronickou hypoxií zkoumán. Větší změny u receptoru v pravé komoře můžeme připsat faktu, že při hypoxii dochází k hypertrofii RV (Haddad et al., 2008). Tato změna pak s sebou může nést i změny v expresi proteinů.

Druhým cílem této práce bylo zjistit lokalizaci jednotlivých komponent adenosinergního signálního systému v membránových mikrodoménách. Tyto části buněčné membrány se specifickým složením lipidů i proteinů mohou sloužit ke zrychlení a větší efektivitě buněčné signalizace, stejně jako k její jednodušší regulaci. Vzhledem k velmi krátkému poločasu života adenosinu v extracelulárním prostředí (Welihinda et al., 2016) by bylo pro efektivní signalizaci vhodné blízké umístění molekul podílejících se na jeho tvorbě a adenosinových receptorů. Extracelulární membránový enzym CD73, který odbourává AMP na adenosin, byl objeven v kaveolách (Strohmeier et al., 1997). Stejně tak byly v kaveolách objeveny další komponenty adenosinové signální dráhy jako G-proteiny a AC (Ostrom and Insel, 2004). To se podařilo zopakovat i nám, jak je vidět na Obr. 26-30. Avšak o lokalizaci adenosinových receptorů v membránových mikrodoménách není mnoho zmínek. Stejně tak nevíme o lokalizaci

nukleosidových transportérů, které jsou vedle enzymu CD73 druhým zdrojem extracelulárního adenosinu.

Pro izolaci membránových mikrodomén byly použity dva různé solubilizační roztoky – Triton X-100 a uhličitan sodný (Na_2CO_3). Následnou centrifugací byly jednotlivé frakce odděleny (Rubin and Ismail-Beigi, 2003). Jako marker správného rozdělení membránových mikrodomén byl použit kaveolin-1 pro lipidové rafty a transferinový receptor CD71 pro většinovou (neraftovou) část membrány. Obr. 9 a Obr. 10 ukazují výřezy imunoblotů znázorňujících distribuci kaveolinu-1. Je na nich vidět, že v obou případech byl kaveolin-1 detekován v raftové frakci membrány (P). Slabý signál ve většinové (neraftové) části membrány může naznačovat příliš vysokou koncentraci použitých solubilizačních roztoků. Obr. 11 ukazuje expresi membránového proteinu CD71. I zde se nachází slabý signál také v opačné frakci, ale většina signálu zůstává ve většinové (neraftové) frakci membrán (S).

Receptor A_1 byl ve vzorcích membránových mikrodomén získaných solubilizací s Tritonem X-100 detekován ve většinové (neraftové) frakci membrány (S), i když slabý signál sledujeme i v raftové části (P). Ze vzorků získaných solubilizací s Na_2CO_3 se bohužel nepodařilo získat hodnotitelné výsledky. Signál byl však také zřetelně silnější v solubilní frakci. V obou případech nám tedy vyšla opačná lokalizace než publikovali Lasley et al., 2000. Ti ukázali přítomnost většiny receptoru A_1 (67 %) v kaveolách za klidových podmínek, po přidání agonisty pak difundoval z kaveol do okolní membrány (Lasley et al., 2000). Dále byla také popsána internalizace receptoru prostřednictvím kaveol (Escrive et al., 2003). Možným vysvětlením odlišných výsledků získaných v našich experimentálních podmínkách by mohlo být použití jiného způsobu izolace membránových mikrodomén.

O lokalizaci receptoru A_{2A} v kaveolách není mnoho zmínek. Pouze jedna studie uvádí lokalizaci receptoru v membránových mikrodoménách, a to v míšních neuronech potkana (Mojsilovic-Petrovic et al., 2006). Nám se podařilo ukázat umístění receptoru v kaveolách i v srdci. U vzorků membránových mikrodomén získaných solubilizací s Tritonem X-100 se nám bohužel podařilo získat pouze dva hodnotitelné výsledky. Přesto je zřetelné, že téměř všude signál byl právě ve frakci odpovídající membránovým mikrodoménám (P). Ve vzorcích získaných solubilizací s Na_2CO_3 tam

pak byl přítomen veškerý signál. U těchto vzorků se pak také ukázaly statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami adaptace. V levé komoře došlo k nárůstu množství receptoru u skupiny CNH. Toto můžeme, i když v mnohem menší míře, sledovat i u vzorků získaných solubilizací s Tritonem. Může se zřejmě jednat o adaptivní reakci kardiomyocytů na hypoxii. V pravé komoře pak došlo k nárůstu u skupiny INH/R v obou vzorcích, i když rozdíl byl signifikantní pouze u vzorků získaných solubilizací s Na_2CO_3 . U vzorků získaných solubilizací s Tritonem X-100 se vzhledem k malému počtu vyhodnocených výsledků žádný statisticky významný rozdíl očekávat nedá.

U receptoru A_{2B} byla už dříve odhalena lokalizace spíše ve většinové (nekaveolární) části membrány (S) (Sitaraman et al., 2002). To se potvrdilo i v našich výsledcích. Téměř stejné rozložení receptoru se ukázalo ve vzorcích získaných solubilizací s Tritonem X-100 i s Na_2CO_3 , v pravé i levé komoře, stejně jako u všech skupin adaptace. Ani rozdíly v distribuci u jednotlivých skupin adaptace, které jsme získali u vzorků hrubých membrán, se zde nepotvrdily.

O receptoru A_3 nejsou v souvislosti s lokalizací v membránových mikrodoménách žádné zmínky. Ani nám se to však nepodařilo zcela objasnit. Získali jsme totiž odlišné výsledky u jednotlivých vzorků. U vzorků membránových mikrodomén získaných solubilizací s Tritonem X-100 se ukázala statisticky významná lokalizace receptoru v raftové frakci membrány (P). Signál ve většinové (nekaveolární) části membrány (S) byl velmi slabý. U vzorků získaných solubilizací s Na_2CO_3 se ukázala lokalizace opačná. Silnější byl signál ve frakci S, ale signál ve frakci P byl také poměrně silný. Důvodem tohoto rozdílu je pravděpodobně odlišný způsob solubilizace vzorků. Vzhledem k tomu, že použité solubilizační roztoky fungují jiným způsobem, mohou také solubilizovat trochu jiné části buněčné membrány.

Dále byly v membránových mikrodoménách detekovány nukleosidové transportéry ENT1, ENT2 a CNT2. O výskytu nukleosidových transportérů v kaveolách existuje pouze pár zmínek. Výzkum Duflota (2002) uvádí lokalizaci transportéru CNT1 v kaveolách. Ten je však pro náš výzkum nedůležitý, neboť se jednak nenachází v srdci (Hamilton et al., 2001) a také nefunguje jako transportér pro adenosin (Larrayoz et al.,

2004). Další výzkum (Errasti-Murugarren et al., 2010) ukazuje lokalizaci transportéru CNT3, kterým jsme se ale v této práci také nezabývali.

Transportér ENT1 byl detekován převážně ve většinové (nekaveolární) části membrány (S). A to jak ve vzorcích získaných solubilizací s Tritonem X-100, tak ve vzorcích získaných solubilizací s Na_2CO_3 . Slabý signál bylo možné sledovat i v raftové frakci (P), tudíž můžeme předpokládat částečnou lokalizaci tohoto transportéru v kaveolách.

Ve vzorcích získaných solubilizací s Tritonem X-100 lokalizoval transportér ENT2 spíše ve většinové (nekaveolární) části membrány (S), i když signál v raftové frakci membrány (P) byl také zřetelný. Ve vzorcích získaných solubilizací s Na_2CO_3 se pak signál ve frakci P téměř vyrovnal se signálem ve frakci S. Menší zastoupení transportéru v raftové frakci u vzorků získaných solubilizací s Tritonem X-100 můžeme přičíst tomu, že se jedná o poměrně silný detergent. Mohl tedy část raftů rozrušit a signál se pak ukázal ve větší míře v solubilní frakci.

U membránové lokalizace posledního zkoumaného transportéru CNT2 jsme naším výzkumem ukázali spíše další otázky než odpovědi. U vzorků získaných solubilizací s Tritonem X-100 se téměř všechen signál nacházel ve většinové (nekaveolární) části membrány (S). Ve vzorcích získaných solubilizací s Na_2CO_3 tomu pak bylo úplně naopak – signifikantně větší část signálu se ukázala v raftové frakci membrány (P). Tento rozdíl si úplně neumíme vysvětlit, ale mohlo by jít například o izolaci jiných typů membránových mikrodomén použitými solubilizačními roztoky.

Pro doplnění výsledků jsme se rozhodli do práce zařadit i další předběžný experiment, který zahrnoval provedení ischemie srdce. V tomto pokusu byli vedle kontrolních potkanů (K) použiti potkani adaptovaní na intermitentní normobarickou hypoxii, kteří byli chováni 8 h denně v hypoxii (10% O_2) a zbylých 16 h v normoxii. Tento typ adaptace prokazuje také protektivní účinky (Neckár et al., 2002). Po usmrcení potkanů byla srdce rychle vyjmuta a zavěšena na Langendorffův perfúzní systém, kde byla nejdříve 15 minut stabilizována pak jim byla provedena desetiminutová ischemie zastavením průtoku pufru a následovala reperfúze po dobu 30 minut. Pak jsme sledovali expresi adenosinových receptorů $\text{A}_{2\text{B}}$ a A_3 .

Přestože se u výsledků exprese receptoru A_{2B} neukázala statistická významnost, byly vidět jasné tendence ke změně mezi jednotlivými skupinami. U vzorků potkanů adaptovaných na hypoxii byl vidět pokles množství receptoru v levé komoře a naopak nárůst v komoře pravé v porovnání s kontrolními vzorky. To může souviset s hypertrofií RV, ke které při adaptaci dochází. Dále jsme zjistili pokles množství receptoru u vzorků srdcí perfundovaných pomocí pumpy (P) ve srovnání se vzorky srdcí, do kterých pufr volně tekla pouze pomocí gravitace (T). Tato srdce si pak roztok odebírala ve fázi dilatace, což je fyziologický stav. Když byl naopak roztok do srdcí pumpován po celou dobu, mohlo zde dojít k jejich většímu reperfúznímu poškození. To mohlo případně vést k poklesu množství receptorů.

U receptoru A_3 se neukázala žádná změna mezi jednotlivými vzorky. Jediné, co můžeme sledovat, je mírný pokles množství receptoru v pravé komoře v porovnání s levou.

11. Závěr

Hlavním cílem této práce byla charakteristika adenosinergního signálního systému v myokardu potkanů po adaptaci na dva různé typy chronické hypoxie. Konkrétně jsme se zaměřili na adenosinové receptory (A_1 , A_{2A} , A_{2B} a A_3) a nukleosidové transportéry (ENT1, ENT2 a CNT2).

U vzorků hrubých membrán jsme sledovali největší rozdíly mezi jednotlivými skupinami adaptace u receptoru A_{2B} . Došlo zde k nárůstu množství receptoru u kardioprotektivního typu adaptace (CNH) a naopak k poklesu u neprotektivní adaptace (INH/R). To napovídá hypotéze, že by se tento receptor mohl uplatňovat v kardioprotekci adaptací na chronickou hypoxii. Také u receptoru A_3 došlo v pravé komoře k nárůstu u skupiny CNH. U ostatních receptorů se neukázaly statisticky významné rozdíly.

Z výsledku rozmístění jednotlivých molekul na buněčné membráně vyplývá, že membránové mikrodomény se mohou účastnit regulace adenosinové signalizace. Extracelulární adenosin může pocházet ze dvou zdrojů. Buď vzniká přímo v extracelulárním prostředí činností enzymu CD73, nebo je tvořen v buňce a do extracelulárního prostoru transportován ekvilibračními nukleosidovými transportéry.

U enzymu CD73 byla popsána jeho lokalizace v kaveolách (Strohmeier et al., 1997). Naopak u ENT jsme zjistili jejich lokalizaci spíše ve většinové (neraftové) části membrány. U receptorů A_1 a A_{2B} jsme pak pozorovali jejich převážnou distribuci také ve většinové (neraftové) části membrány. Naopak receptory A_{2A} a A_3 byly lokalizovány spíše v raftech. To by mohlo znamenat, že adenosin, který je tvořen v buňce a následně přenesen ven pomocí ENT, aktivuje preferenčně receptory A_1 a A_{2B} . Naopak adenosin, který vzniká extracelulárně odbouráním AMP, by pak mohl aktivovat receptory A_{2A} a A_3 . Signalizace působením extracelulárně vzniklého adenosinu preferenčně prostřednictvím receptoru A_{2A} už byla ukázána (Cunha et al., 1996) a společná lokalizace tohoto receptoru s CD73 v kaveolách by mohla v tomto případě být důvodem k efektivnější signalizaci.

V doplňkovém pokusu jsme sledovali vliv ischemie na srdce potkanů adaptovaných na intermitentní hypoxii (H) v porovnání s kontrolou (K). Stejně jako u

protektivní kontinuální hypoxie jsme sledovali nárůst množství receptoru A_{2B} v pravé komoře myokardu. Naopak v levé komoře došlo k poklesu.

Celkově jsme tak ukázali změny v expresi hlavně adenosinového receptoru A_{2B} při adaptaci na chronickou hypoxii. To podporuje hypotézu, že by se tento receptor mohl účastnit kardioprotektivního mechanismu indukovaného adaptací na chronickou hypoxii. Pro určení jeho přesné úlohy jsou však potřeba další výzkumy. Například by bylo možné zkoumat vlivy agonistů a antagonistů tohoto receptoru podávaných při adaptaci na chronickou hypoxii. Určení role receptoru A_{2B} ale i dalších adenosinových receptorů v kardioprotekci by pak mohlo přispět k vývoji nových léčiv.

12. Literatura

Abbracchio, M.P., Brambilla, R., Ceruti, S., Kim, H.O., von Lubitz, D.K., Jacobson, K.A., and Cattabeni, F. (1995). G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain. *Mol. Pharmacol.* *48*, 1038–1045.

Ahmad, A., Ahmad, S., Glover, L., Miller, S.M., Shannon, J.M., Guo, X., Franklin, W.A., Bridges, J.P., Schaack, J.B., Colgan, S.P., et al. (2009). Adenosine A2A receptor is a unique angiogenic target of HIF-2 in pulmonary endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 10684–10689.

Amadio, S., Apolloni, S., D'Ambrosi, N., and Volonté, C. (2011). Purinergic signalling at the plasma membrane: a multipurpose and multidirectional mode to deal with amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis. *J. Neurochem.* *116*, 796–805.

Anderson, R.G. (1993). Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 10909–10913.

Aymerich, I., Foufelle, F., Ferré, P., Casado, F.J., and Pastor-Anglada, M. (2006). Extracellular adenosine activates AMP-dependent protein kinase (AMPK). *J. Cell Sci.* *119*, 1612–1621.

Baldwin, S. a, Yao, S.Y.M., Hyde, R.J., Ng, A.M.L., Foppolo, S., Barnes, K., Ritzel, M.W.L., Cass, C.E., and Young, J.D. (2005). Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *J. Biol. Chem.* *280*, 15880–15887.

Barnes, K., Dobrzynski, H., Foppolo, S., Beal, P.R., Ismat, F., Scullion, E.R., Sun, L., Tellez, J., Ritzel, M.W.L., Claycomb, W.C., et al. (2006). Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH. *Circ. Res.* *99*, 510–519.

Barsotti, C., and Ipata, P.L. (2004). Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 2214–2225.

Bolli, R., Manchikalapudi, S., Tang, X.-L., Takano, H., Qiu, Y., Guo, Y., Zhang, Q., and Jadoon, A.K. (1997). The Protective Effect of Late Preconditioning Against Myocardial Stunning in Conscious Rabbits Is Mediated by Nitric Oxide Synthase : Evidence That Nitric Oxide Acts Both as a Trigger and as a Mediator of the Late Phase of Ischemic Preconditioning. *Circ. Res.* *81*, 1094–1107.

Brown, S.T., Reyes, E.P., and Nurse, C.A. (2011). Chronic hypoxia upregulates adenosine 2a receptor expression in chromaffin cells via hypoxia inducible factor-2 α : role in modulating secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *412*, 466–472.

Carr, C. (1997). Evidence for a role for both the adenosine A1 and A3 receptors in

protection of isolated human atrial muscle against simulated ischaemia. *Cardiovasc. Res.* **36**, 52–59.

Cordeaux, Y., Ijzerman, A.P., and Hill, S.J. (2004). Coupling of the human A1 adenosine receptor to different heterotrimeric G proteins: evidence for agonist-specific G protein activation. *Br. J. Pharmacol.* **143**, 705–714.

Cunha, R.A., Correia-de-Sá, P., Sebastião, A.M., and Ribeiro, J.A. (1996). Preferential activation of excitatory adenosine receptors at rat hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed from released adenine nucleotides. *Br. J. Pharmacol.* **119**, 253–260.

Decking, U.K.M., Schlieper, G., Kroll, K., and Schrader, J. (1997). Hypoxia-Induced Inhibition of Adenosine Kinase Potentiates Cardiac Adenosine Release. *Circ. Res.* **81**, 154–164.

Deussen, a., Stappert, M., Schafer, S., and Kelm, M. (1999). Quantification of Extracellular and Intracellular Adenosine Production: Understanding the Transmembranous Concentration Gradient. *Circulation* **99**, 2041–2047.

Deussen, A., Lloyd, H.G.E., and Schrader, J. (1989). Contribution of S-adenosylhomocysteine to cardiac adenosine formation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **21**, 773–782.

Duflot, S. (2002). Concentrative Nucleoside Transporter (rCNT1) Is Targeted to the Apical Membrane through the Hepatic Transcytotic Pathway. *Exp. Cell Res.* **281**, 77–85.

Eckle, T., Krahn, T., Grenz, A., Köhler, D., Mittelbronn, M., Ledent, C., Jacobson, M. a, Osswald, H., Thompson, L.F., Unertl, K., et al. (2007). Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors. *Circulation* **115**, 1581–1590.

Eckle, T., Köhler, D., Lehmann, R., El Kasmi, K., and Eltzschig, H.K. (2008). Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning. *Circulation* **118**, 166–175.

Eckle, T., Hartmann, K., Bonney, S., Reithel, S., Mittelbronn, M., Walker, L.A., Lowes, B.D., Han, J., Borchers, C.H., Buttrick, P.M., et al. (2012). Adora2b-elicited Per2 stabilization promotes a HIF-dependent metabolic switch crucial for myocardial adaptation to ischemia. *Nat. Med.* **18**, 774–782.

Eckle, T., Hughes, K., Ehrentaut, H., Brodsky, K.S., Rosenberger, P., Choi, D.-S.S., Ravid, K., Weng, T., Xia, Y., Blackburn, M.R., et al. (2013). Crosstalk between the equilibrative nucleoside transporter ENT2 and alveolar Adora2b adenosine receptors dampens acute lung injury. *FASEB J.* **27**, 3078–3089.

Eltzschig, H.K., Abdulla, P., Hoffman, E., Hamilton, K.E., Daniels, D., Schönfeld, C.,

Löffler, M., Reyes, G., Duszenko, M., Karhausen, J., et al. (2005). HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia. *J. Exp. Med.* 202, 1493–1505.

Eltzschig, H.K., Köhler, D., Eckle, T., Kong, T., Robson, S.C., Sean, P., Dc, W., Ko, D., and Colgan, S.P. (2010). Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia / ischemia protection. *Blood* 113, 224–232.

Errasti-Murugarren, E., Molina-Arcas, M., Casado, F.J., and Pastor-Anglada, M. (2009). A splice variant of the SLC28A3 gene encodes a novel human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) protein localized in the endoplasmic reticulum. *FASEB J.* 23, 172–182.

Errasti-Murugarren, E., Molina-Arcas, M., Casado, F.J., and Pastor-Anglada, M. (2010). The human concentrative nucleoside transporter-3 C602R variant shows impaired sorting to lipid rafts and altered specificity for nucleoside-derived drugs. *Mol. Pharmacol.* 78, 157–165.

Escrache, M., Burgueño, J., Ciruela, F., Canela, E.I., Mallol, J., Enrich, C., Lluís, C., and Franco, R. (2003). Ligand-induced caveolae-mediated internalization of A1 adenosine receptors: morphological evidence of endosomal sorting and receptor recycling. *Exp. Cell Res.* 285, 72–90.

Feldhaus, L.M., and Liedtke, A.J. (1998). mRNA Expression of Glycolytic Enzymes and Glucose Transporter Proteins in Ischemic Myocardium With and Without Reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 2475–2485.

Fredholm, B.B. (2010). Adenosine receptors as drug targets. *Exp. Cell Res.* 316, 1284–1288.

Fredholm, B.B., IJzerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.-N., and Linden, J. (2001a). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol. Rev.* 53, 527–552.

Fredholm, B.B., Irenius, E., Kull, B., and Schulte, G. (2001b). Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Pharmacol.* 61, 443–448.

Gourine, A. V., Llaudet, E., Dale, N., and Spyer, K.M. (2005). Release of ATP in the Ventral Medulla during Hypoxia in Rats: Role in Hypoxic Ventilatory Response. *J. Neurosci.* 25, 1211–1218.

Guo, Y., Tukaye, D.N., Wu, W.-J., Zhu, X., Book, M., Tan, W., Jones, S.P., Rokosh, G., Narumiya, S., Li, Q., et al. (2012). The COX-2/PGI2 Receptor Axis Plays an Obligatory Role in Mediating the Cardioprotection Conferred by the Late Phase of Ischemic Preconditioning. *PLoS One* 7, e41178.

Haapanen, H., Herajärvi, J., Arvola, O., Anttila, T., Starck, T., Kallio, M., Anttila, V., Tuominen, H., Kiviluoma, K., and Juvonen, T. (2016). Remote ischemic preconditioning protects the spinal cord against ischemic insult: An experimental study in a porcine model. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 151, 777–785.

Haddad, F., Hunt, S.A., Rosenthal, D.N., and Murphy, D.J. (2008). Right ventricular function in cardiovascular disease, part I: Anatomy, physiology, aging, and functional assessment of the right ventricle. *Circulation* 117, 1436–1448.

Hahnova, K., Kasparova, D., Zurmanova, J., Neckar, J., Kolar, F., and Novotny, J. (2016). β -Adrenergic signaling in rat heart is similarly affected by continuous and intermittent normobaric hypoxia. *Gen. Physiol. Biophys.* 35, 165–173.

Hamilton, S.R., Yao, S.Y., Ingram, J.C., Hadden, D. a, Ritzel, M.W., Gallagher, M.P., Henderson, P.J., Cass, C.E., Young, J.D., and Baldwin, S. a (2001). Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter rCNT1. *J. Biol. Chem.* 276, 27981–27988.

Hammond, L.C., Bonnet, C., Kemp, P.J., Yates, M.S., and Bowmer, C.J. (2004). Chronic hypoxia up-regulates expression of adenosine A1 receptors in DDT1-MF2 cells. *Biochem. Pharmacol.* 67, 421–426.

Hart, M.L., Much, C., Gorzolla, I.C., Schittenhelm, J., Kloor, D., Stahl, G.L., and Eltzschig, H.K. (2008). Extracellular adenosine production by ecto-5'-nucleotidase protects during murine hepatic ischemic preconditioning. *Gastroenterology* 135, 1739–1750.e3.

Hurtado, A. (1960). Some clinical aspects of life at high altitudes. *Ann. Intern. Med.* 53, 247–258.

Chang, W.J. (1992). Lowering the cholesterol content of MA104 cells inhibits receptor-mediated transport of folate. *J. Cell Biol.* 118, 63–69.

Jacobson, K.A., and Gao, Z.-G. (2006). Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 247–264.

Kiss, a, Farah, K., Kim, J., Garriock, R.J., Drysdale, T. a, Hammond, J.R., A, K., K, F., J, K., R, G., et al. (2000). Molecular cloning and functional characterization of inhibitor-sensitive (mENT1) and inhibitor-resistant (mENT2) equilibrative nucleoside transporters from mouse brain. *Biochem. J.* 352 Pt 2, 363–372.

Kitakaze, M., Minamino, T., Node, K., Takashima, S., Funaya, H., Kuzuya, T., and Hori, M. (1999). Adenosine and Cardioprotection in the Diseased Heart. *Jpn. Circ. J.* 63, 231–243.

Kobayashi, S., Beitner-Johnson, D., Conforti, L., and Millhorn, D.E. (1998). Chronic hypoxia reduces adenosine A_{2A} receptor-mediated inhibition of calcium current in rat

PC12 cells via downregulation of protein kinase A. *J. Physiol.* 512, 351–363.

Kobilka, B.K. (2007). G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1768, 794–807.

Kong, T., Westerman, K.A., Faigle, M., Eltzschig, H.K., and Colgan, S.P. (2006). HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. *FASEB J.* 20, 2242–2250.

Kroll, K., Decking, U.K., Dreikorn, K., and Schrader, J. (1993). Rapid turnover of the AMP-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart. *Circ. Res.* 73, 846–856.

Kuno, A., Critz, S.D., Cui, L., Solodushko, V., Yang, X.-M., Krahn, T., Albrecht, B., Philipp, S., Cohen, M. V., and Downey, J.M. (2007). Protein kinase C protects preconditioned rabbit hearts by increasing sensitivity of adenosine A2b-dependent signaling during early reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 43, 262–271.

Lankford, A.R., Yang, J.-N., Rose'Meyer, R., French, B.A., Matherne, G.P., Fredholm, B.B., and Yang, Z. (2006). Effect of modulating cardiac A1 adenosine receptor expression on protection with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H1469–H1473.

Larrayoz, I.M., Casado, F.J., Pastor-Anglada, M., and Lostao, M.P. (2004). Electrophysiological Characterization of the Human Na⁺/Nucleoside Cotransporter 1 (hCNT1) and Role of Adenosine on hCNT1 Function. *J. Biol. Chem.* 279, 8999–9007.

Lasley, R.D., Narayan, P., Uittenbogaard, A., and Smart, E.J. (2000). Activated Cardiac Adenosine A1 Receptors Translocate Out of Caveolae. *J. Biol. Chem.* 275, 4417–4421.

Liu, G.S., Thornton, J., Van Winkle, D.M., Stanley, A.W., Olsson, R.A., and Downey, J.M. (1991). Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 84, 350–356.

Liu, Y., Sato, T., O'Rourke, B., and Marban, E. (1998). Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 97, 2463–2469.

Liu, Y., An, S., Ward, R., Yang, Y., Guo, X.-X., Li, W., and Xu, T.-R. (2016). G protein-coupled receptors as promising cancer targets. *Cancer Lett.* 376, 226–239.

Livermore, S., and Nurse, C.A. (2013). Enhanced adenosine A2b receptor signaling facilitates stimulus-induced catecholamine secretion in chronically hypoxic carotid body type I cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 305, C739–C750.

Maldonado, C., Pushpakumar, S.B., Perez-Abadia, G., Arumugam, S., and Lane, A.N. (2013). Administration of exogenous adenosine triphosphate to ischemic skeletal muscle induces an energy-sparing effect: role of adenosine receptors. *J. Surg. Res.* 181, e15–e22.

Marber, M.S., Latchman, D.S., Walker, J.M., and Yellon, D.M. (1993). Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 88, 1264–1272.

Medina-Pulido, L., Molina-Arcas, M., Justicia, C., Soriano, E., Burgaya, F., Planas, A.M., and Pastor-Anglada, M. (2013). Hypoxia and P1 receptor activation regulate the high-affinity concentrative adenosine transporter CNT2 in differentiated neuronal PC12 cells. *Biochem. J.* 454, 437–445.

Mojsilovic-Petrovic, J., Jeong, G.-B., Crocker, A., Arneja, A., David, S., Russell, D.S., Russell, D.S., and Kalb, R.G. (2006). Protecting Motor Neurons from Toxic Insult by Antagonism of Adenosine A2a and Trk Receptors. *J. Neurosci.* 26, 9250–9263.

Morote-Garcia, J.C., Rosenberger, P., Kuhlicke, J., Eltzschig, H.K., Fredholm, B., Sitkovsky, M., Lukashev, D., Linden, J., Eltzschig, H., Ibla, J., et al. (2008). HIF-1-dependent repression of adenosine kinase attenuates hypoxia-induced vascular leak. *Blood* 111, 5571–5580.

Morote-Garcia, J.C., Rosenberger, P., Nivillac, N.M.I., Coe, I.R., and Eltzschig, H.K. (2009). Hypoxia-inducible factor-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter 2 attenuates mucosal inflammation during intestinal hypoxia. *Gastroenterology* 136, 607–618.

Mundell, S., and Kelly, E. (2011). Adenosine receptor desensitization and trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 1319–1328.

Murray, C.J., and Lopez, A.D. (1997). Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349, 1498–1504.

Murry, C.E., Jennings, R.B., and Reimer, K.A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124–1136.

Neckar, J., Grover, G.J., and Neckár, J. (2002). Effects of mitochondrial KATP modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc. Res.* 55, 567–575.

Neckár, J., Papousek, F., Nováková, O., Ostádal, B., and Kolár, F. (2002). Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Res. Cardiol.* 97, 161–167.

Neckár, J., Borchert, G.H., Hlousková, P., Mícová, P., Nováková, O., Novák, F., Hroch, M., Papousek, F., Ostádal, B., and Kolár, F. (2013). Brief daily episode of normoxia inhibits cardioprotection conferred by chronic continuous hypoxia. Role of oxidative stress and BKCa channels. *Curr. Pharm. Des.* 19, 6880–6889.

Ostrom, R.S., and Insel, P.A. (2004). The evolving role of lipid rafts and caveolae

in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *Br. J. Pharmacol.* 143, 235–245.

Panjehpour, M., Castro, M., and Klotz, K.-N. (2005). Human breast cancer cell line MDA-MB-231 expresses endogenous A_{2B} adenosine receptors mediating a Ca²⁺ signal. *Br. J. Pharmacol.* 145, 211–218.

Patel, R.A.G., Glover, D.K., Broisat, A., Kabul, H.K., Ruiz, M., Goodman, N.C., Kramer, C.M., Meerdink, D.J., Linden, J., and Beller, G.A. (2009). Reduction in myocardial infarct size at 48 hours after brief intravenous infusion of ATL-146e, a highly selective adenosine A_{2A} receptor agonist. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H637–H642.

Rittiner, J.E., Korboukh, I., Hull-Ryde, E.A., Jin, J., Janzen, W.P., Frye, S. V, and Zylka, M.J. (2012). AMP is an adenosine A₁ receptor agonist. *J. Biol. Chem.* 287, 5301–5309.

Ritzel, M.W.L., Ng, A.M.L., Yao, S.Y.M., Graham, K., Loewen, S.K., Smith, K.M., Ritzel, R.G., Mowles, D.A., Carpenter, P., Chen, X.-Z., et al. (2001). Molecular Identification and Characterization of Novel Human and Mouse Concentrative Na⁺-Nucleoside Cotransporter Proteins (hCNT3 and mCNT3) Broadly Selective for Purine and Pyrimidine Nucleosides (System cib). *J. Biol. Chem.* 276, 2914–2927.

Rivkees, S.A., and Wendler, C.C. (2013). Regulation of Cardiovascular Development by Adenosine and Adenosine-Mediated Embryo Protection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 851–855.

Rubin, D., and Ismail-Beigi, F. (2003). Distribution of Glut1 in detergent-resistant membranes (DRMs) and non-DRM domains: effect of treatment with azide. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285, C377–C383.

Sadigh, B., Quintana, M., Sylvén, C., Berglund, M., and Brodin, L.A. (2009). The ischemic preconditioning effect of adenosine in patients with ischemic heart disease. *Cardiovasc. Ultrasound* 7, 52.

Dos Santos-Rodrigues, A., Grañé-Boladeras, N., Bicket, A., and Coe, I.R. (2014). Nucleoside transporters in the purinome. *Neurochem. Int.* 73, 229–237.

Schulte, G., and Fredholm, B.B. (2000). Human Adenosine A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃ Receptors Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells All Mediate the Phosphorylation of Extracellular-Regulated Kinase 1/2. *Mol. Pharmacol.* 58, 477–482.

Schulte, G., and Fredholm, B.B. (2003). Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell. Signal.* 15, 813–827.

Sitaraman, S. V., Wang, L., Wong, M., Bruewer, M., Hobert, M., Yun, C.-H., Merlin, D., and Madara, J.L. (2002). The Adenosine 2b Receptor Is Recruited to the

Plasma Membrane and Associates with E3KARP and Ezrin upon Agonist Stimulation. *J. Biol. Chem.* 277, 33188–33195.

Smith, K.M., Ng, A.M.L., Yao, S.Y.M., Labedz, K.A., Knaus, E.E., Wiebe, L.I., Cass, C.E., Baldwin, S.A., Chen, X.-Z., Karpinski, E., et al. (2004). Electrophysiological characterization of a recombinant human Na⁺-coupled nucleoside transporter (hCNT1) produced in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 558, 807–823.

Smith, K.M., Slugoski, M.D., Loewen, S.K., Ng, A.M.L., Yao, S.Y.M., Chen, X.-Z., Karpinski, E., Cass, C.E., Baldwin, S. a, and Young, J.D. (2005). The broadly selective human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT3) exhibits novel cation-coupled nucleoside transport characteristics. *J. Biol. Chem.* 280, 25436–25449.

Smith, K.M., Slugoski, M.D., Cass, C.E., Baldwin, S. a, Karpinski, E., and Young, J.D. (2007). Cation coupling properties of human concentrative nucleoside transporters hCNT1, hCNT2 and hCNT3. *Mol. Membr. Biol.* 24, 53–64.

Solenkova, N. V, Solodushko, V., Cohen, M. V, and Downey, J.M. (2006). Endogenous adenosine protects preconditioned heart during early minutes of reperfusion by activating Akt. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H441–H449.

Strohmeier, G.R., Lencer, W.I., Patapoff, T.W., Thompson, L.F., Carlson, S.L., Moe, S.J., Carnes, D.K., Mrsny, R.J., and Madara, J.L. (1997). Surface expression, polarization, and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia. *J. Clin. Invest.* 99, 2588–2601.

Sundaram, M., Yao, S.Y., Ingram, J.C., Berry, Z.A., Abidi, F., Cass, C.E., Baldwin, S.A., and Young, J.D. (2001). Topology of a human equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive nucleoside transporter (hENT1) implicated in the cellular uptake of adenosine and anti-cancer drugs. *J. Biol. Chem.* 276, 45270–45275.

Synnestvedt, K., Furuta, G.T., Comerford, K.M., Louis, N., Karhausen, J., Eltzschig, H.K., Hansen, K.R., Thompson, L.F., and Colgan, S.P. (2002). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J. Clin. Invest.* 110, 993–1002.

Tajima, M., Katayose, D., Bessho, M., and Isoyama, S. (1994). Acute ischaemic preconditioning and chronic hypoxia independently increase myocardial tolerance to ischaemia. *Cardiovasc. Res.* 28, 312–319.

Toller, W.G., Gross, E.R., Kersten, J.R., Pagel, P.S., Gross, G.J., and Warltier, D.C. (2000). Sarcolemmal and Mitochondrial Adenosine Triphosphate– dependent Potassium Channels: Mechanism of desflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* 92, 1731–1739.

Tracey, W. (1997). Selective adenosine A3 receptor stimulation reduces ischemic myocardial injury in the rabbit heart. *Cardiovasc. Res.* 33, 410–415.

Turek, Z., Kubát, K., Ringnalda, B.E.M., and Kreuzer, F. (1980). Experimental myocardial infarction in rats acclimated to simulated high altitude. *Basic Res. Cardiol.* 75, 544–554.

Ullah, M.S., Davies, A.J., and Halestrap, A.P. (2006). The Plasma Membrane Lactate Transporter MCT4, but Not MCT1, Is Up-regulated by Hypoxia through a HIF-1 -dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* 281, 9030–9037.

Wang, J., Su, S.F., Dresser, M.J., Schaner, M.E., Washington, C.B., Giacomini, K.M., Belardinelli, L., Linden, J., Berne, R.M., Britten, R.J., et al. (1997). Na(+)-dependent purine nucleoside transporter from human kidney: cloning and functional characterization. *Am. J. Physiol.* 273, F1058–F1065.

Welihinda, A.A., Kaur, M., Greene, K., Zhai, Y., and Amento, E.P. (2016). The adenosine metabolite inosine is a functional agonist of the adenosine A2A receptor with a unique signaling bias. *Cell. Signal.* 28, 552–560.

Van Winkle, D.M., Chien, G.L., Wolff, R.A., Soifer, B.E., Kuzume, K., and Davis, R.F. (1994). Cardioprotection provided by adenosine receptor activation is abolished by blockade of the KATP channel. *Am. J. Physiol.* 266, H829–H839.

Wolff, G., Truse, R., and Decking, U. (2015). Extracellular Adenosine Formation by Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Is No Essential Trigger for Early Phase Ischemic Preconditioning. *PLoS One* 10, e0135086.

Xi, J., McIntosh, R., Shen, X., Lee, S., Chanoit, G., Criswell, H., Zvara, D.A., and Xu, Z. (2009). Adenosine A2A and A2B receptors work in concert to induce a strong protection against reperfusion injury in rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 47, 684–690.

Yang, X., Cohen, M. V., and Downey, J.M. (2010). Mechanism of Cardioprotection by Early Ischemic Preconditioning. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 24, 225–234.

Young, J.D., Yao, S.Y.M., Baldwin, J.M., Cass, C.E., and Baldwin, S.A. (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol. Aspects Med.* 34, 529–547.

Zaugg, M., and Schaub, M.M.C. (2003). Signaling and cellular mechanisms in cardiac protection by ischemic and pharmacological preconditioning. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 24, 219–249.